

## **Desempenho do método Ogawa-Kudoh em cultura de *Mycobacterium tuberculosis* de amostras paucibacilares**

### **Ogawa–Kudoh method performance in *Mycobacterium tuberculosis* culture of paucibacillary samples**

DOI:10.34117/bjdv7n6-713

Recebimento dos originais: 30/05/2021

Aceitação para publicação: 30/06/2021

#### **Paulo Ricardo de Souza Moraes**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Campo Grande, MS, Brasil  
Cidade Universitária s/n, Unidade 9 - Campo Grande - MS  
E-mail: [moraespr@terra.com.br](mailto:moraespr@terra.com.br)

#### **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Marques**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Instituto Integrado de Saúde. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Família. Campo Grande, MS, Brasil  
Cidade Universitária s/n, Unidade 9 - Campo Grande - MS  
E-mail: [marli.marques2008@gmail.com](mailto:marli.marques2008@gmail.com)

#### **Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Instituto de Biociências. Campo Grande, MS, Brasil  
R. Ufms, S/n - Cidade Universitária, Campo Grande - MS  
E-mail: [albertss@hotmail.com](mailto:albertss@hotmail.com)

#### **Dr<sup>a</sup>. Eunice Atsuko Totumi Cunha**

Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul. Laboratório Central de Saúde Pública. Seção de Micobacteriologia. Campo Grande, MS, Brasil.  
Av. Felinto Müller, 1666 - Campo Grande – MS  
E-mail: [euniceatsuko@uol.com.br](mailto:euniceatsuko@uol.com.br)

#### **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamaria Mello Miranda Paniago**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Campo Grande, MS, Brasil  
Cidade Universitária s/n, Unidade 9 - Campo Grande - MS  
E-mail: [anapaniago@yahoo.com.br](mailto:anapaniago@yahoo.com.br)

## **RESUMO**

**OBJETIVO:** Avaliar o desempenho do método Ogawa – Kudoh (OK) para o diagnóstico de tuberculose em materiais de amostra paucibacilar pulmonar e extrapulmonar, em relação ao processamento de Lowenstein-Jensen (LJ) e Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT). **MÉTODOS:** Este estudo transversal utilizou amostras extrapulmonares e pulmonares (exceto escarro) recebidas no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul entre fevereiro de 2017 e março de 2018. As amostras foram submetidas ao processamento de OK, LJ e MGIT de acordo com o

Manual Nacional de Vigilância Laboratorial de Tuberculose e Outras Micobactérias 2008. RESULTADOS: Um total de 347 amostras (83,3% extrapulmonar, 16,7% pulmonar) foram semeadas em pelo menos um dos três meios (OK: 330; LJ: 314; MGIT: 113). A maioria das amostras extrapulmonares consistia de líquido cefalorraquidiano (28,2%), medula óssea (20,5%) e fragmentos de tecido (16,7%). As amostras pulmonares foram predominantemente lavado brônquico alveolar (6,9%) e secreção traqueal (9,8%). Adotando o MGIT como referência, o OK provou ser 75% sensível e 100% específico. Com LJ como referência, a sensibilidade de OK foi de 57,1% e a especificidade de 96,3%. As categorias de concordância foram as seguintes: OK vs. LJ, moderada ( $\kappa = 0,485$ ); OK vs. MGIT, quase perfeito ( $\kappa = 0,851$ ); LJ vs. MGIT, substancial ( $\kappa = 0,655$ ). O método OK se mostrou preciso e específico para o diagnóstico de tuberculose em materiais de amostra paucibacilar pulmonar e extrapulmonar, fornecendo a mesma precisão que LJ e MGIT, caracterizando a abordagem como uma ferramenta laboratorial valiosa para investigar casos de suspeita de tuberculose em instalações laboratoriais com recursos limitados.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculose, Diagnóstico, Meios de Cultivo

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To assess the performance of the Ogawa–Kudoh (OK) method for tuberculosis diagnosis in pulmonary and extrapulmonary paucibacillary sample materials, relative to Lowenstein-Jensen (LJ) and Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) processing. **METHODS:** This cross-sectional study employed extrapulmonary and pulmonary samples (other than sputum) received at the Mato Grosso do Sul Central Public Health Laboratory between February 2017 and March 2018. The samples were subjected to OK, LJ, and MGIT processing as per the 2008 National Manual for Laboratory Surveillance of Tuberculosis and Other Mycobacteria. **RESULTS:** A total of 347 samples (83.3% extrapulmonary, 16.7% pulmonary) were seeded in at least one of three media (OK: 330; LJ: 314; MGIT: 113). Most extrapulmonary samples consisted of cerebrospinal fluid (28.2%), bone marrow (20.5%), and tissue fragments (16.7%). Pulmonary samples were predominantly alveolar bronchial lavage (6.9%) and tracheal secretion (9.8%). Adopting MGIT as a reference, OK proved 75% sensitive and 100% specific. With LJ as the reference, OK sensitivity was 57.1% and specificity 96.3%. Agreement categories were as follows: OK vs. LJ, moderate ( $\kappa = 0.485$ ); OK vs. MGIT, almost perfect ( $\kappa = 0.851$ ); LJ vs. MGIT, substantial ( $\kappa = 0.655$ ). The OK method proved accurate and specific for diagnosing tuberculosis in pulmonary and extrapulmonary paucibacillary sample materials, providing the same accuracy as LJ and MGIT, characterizing the approach as a valuable laboratory tool for investigating cases of suspected tuberculosis in laboratory facilities with limited resources.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, Diagnosis, Culture media

## 1 INTRODUÇÃO

Com 10 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (estimativas de 2020), a tuberculose está entre as dez principais causas de morte, sendo responsável por 1,2

milhões de mortes, das quais 208.000 envolvem pacientes infectados pelo HIV. Um total de 30 países, incluindo o Brasil, respondem por 84,2% dos casos atuais.<sup>1</sup>

Globalmente, o acesso limitado aos serviços de saúde e a falta de disponibilidade de métodos diagnósticos foram identificados como fatores importantes que contribuem para a subnotificação. Garantir o acesso à saúde para cerca de três milhões de casos “perdidos” representa uma das cinco principais prioridades no esforço para eliminar a tuberculose.<sup>2</sup>

A suspeita de caso é baseada em pelo menos um dos quatro sintomas sugestivos: febre de longa duração, tosse por duas semanas ou mais, suores noturnos e perda de peso. Alterações radiológicas, bem como dados epidemiológicos, como histórico de contato com tuberculose pulmonar ou exposição a outros fatores de risco para aquisição de doença ou reativação endógena também devem ser considerados.<sup>3</sup>

O diagnóstico definitivo, no entanto, só pode ser alcançado pela detecção do agente etiológico em amostras respiratórias ou outros locais (pleural, linfático / ganglionar, osteoarticular, geniturinário, intestinal, peritoneal, pericárdico, ocular, cutâneo ou do sistema nervoso central - a lista não exaustiva).<sup>4,5,6</sup> Atenção especial deve ser dada aos pacientes infectados pelo HIV e portadores de doenças crônicas que podem mascarar os sintomas, retardando a identificação de casos suspeitos de tuberculose.<sup>4</sup>

O teste de BAAR pode confirmar 50-60% dos casos pulmonares, mas a cultura é necessária para amostras extrapulmonares, geralmente paucibacilares e esfregaço negativo,<sup>6</sup> para os quais a taxa de detecção de BAAR mal excede 25% dos casos.<sup>7</sup>

Embora métodos de diagnóstico mais rápidos e sensíveis tenham se tornado recentemente disponíveis (por exemplo, GeneXpert MTB / RIF, um teste de amplificação de ácido nucleico<sup>4</sup>), seu uso no Brasil tem sido dificultado por limitações de recursos financeiros, humanos e de infraestrutura.<sup>8</sup>

Apesar das recomendações para testes de cultura universais em casos de suspeita de tuberculose,<sup>5</sup> nem todas as regiões possuem laboratórios suficientemente equipados e com pessoal para realizar culturas ou testes moleculares rápidos, especialmente em amostras extrapulmonares ou espécimes coletados durante procedimentos hospitalares<sup>7</sup>.

A cultura, considerada o método padrão ouro por sua alta especificidade e sensibilidade, é crucial como exame complementar,<sup>3</sup> detectando 30% de casos adicionais não confirmados por testes de esfregaço anteriores. No entanto, o uso de cultura em grande escala é limitado pelo crescimento lento de micobactérias (2-6 semanas em meio líquido) e pela necessidade de infraestrutura de laboratório de biossegurança de nível 3 e

recursos humanos altamente qualificados, entre outros fatores.<sup>9</sup> Isolados obtidos de culturas também podem servir para outros fins, incluindo teste de sensibilidade a drogas, análise de biologia molecular e sequenciamento genético.<sup>7</sup>

Para culturas de micobactérias, o Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS) usa rotineiramente meio líquido Middlebrook 7H9 (sistema de detecção Bactec MGIT960) para amostras pulmonares e extrapulmonares, e meios de cultura sólidos à base de ovo - a saber, Löwenstein- Jensen (LJ) para amostras pulmonares e extrapulmonares e meio Ogawa-Kudoh (OK) para amostras pulmonares.

Em contraste com essas abordagens padrão, a presente investigação concentrou-se na aplicação do método OK a amostras paucibacilares (líquido de lavagem broncoalveolar, líquido cefalorraquidiano e de outros locais) semeadas no LACEN-MS usando a abordagem OK, com crescimento micobacteriano bem-sucedido, como em uma investigação recente.

O objetivo deste estudo foi investigar o desempenho do método OK no diagnóstico da tuberculose com base em amostras paucibacilares pulmonares e extrapulmonares, em comparação com o processamento LJ e a abordagem do Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT).

## 2 MÉTODOS

Este estudo transversal investigou amostras pulmonares e extrapulmonares (exceto escarro) recebidas no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS) entre fevereiro de 2017 e março de 2018 para teste de BAAR. O laboratório recebe amostras clínicas de todos os serviços de saúde do Estado de Mato Grosso do Sul (Centro-Oeste do Brasil) para confirmação por cultura de tuberculose e testes de sensibilidade a medicamentos. As amostras incluídas no estudo foram provenientes de pacientes com suspeita clínica atendidos em serviços de referência para doenças infecciosas e hospitais do Estado.

Das 8.201 amostras recebidas no período de estudo, 7.829 foram de escarro e 372 pulmão ou amostras extrapulmonares coletadas por meio de procedimentos hospitalares. Das 372 amostras iniciais, 25 foram posteriormente excluídas por estarem abaixo do padrão, não serem identificadas ou por apresentarem volume insuficiente para semeadura em pelo menos um dos três métodos investigados. Um total de 347 amostras foram investigadas: 58 amostras pulmonares (lavagem broncoalveolar ou secreção traqueal) e 289 amostras extrapulmonares.

Amostras de locais não estéreis (por exemplo, urina, secreções, lavagem brônquica) foram descontaminadas e centrifugadas e / ou maceradas antes da semeadura. Amostras estéreis (por exemplo, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, fragmentos de órgãos, sangue, medula óssea) não requerem descontaminação. Todas as amostras foram manuseadas em cabine de segurança biológica e selecionadas para semeadura para cada um dos três métodos.

## 2.1 MÉTODO MGIT: DESCONTAMINAÇÃO, SEMEADURA EM MEIO LÍQUIDO E DETECÇÃO DE BAAR

As amostras foram descontaminadas pelo método de Petroff <sup>11</sup> modificado, da seguinte forma: um volume de 2 mL de amostra foi transferido para um tubo Falcon, para o qual o mesmo volume de solução de NaOH 4% contendo vermelho de fenol (40 g de NaOH, 0,4 g de vermelho de fenol, 1000 mL de água destilada estéril). A mistura foi homogeneizada, mantida a  $36 \pm 1$  °C por 15 min para fluidificação-descontaminação e centrifugada a 3000 x g por 15 min. HCl 1N foi então adicionado ao tubo gota a gota até a cor da mistura mudar para amarelo. Finalmente, uma solução neutralizante (4 g de NaOH, 0,004 g de vermelho de fenol, 0,2 g de sulfato de potássio de alumínio, 1000 mL de água destilada estéril) foi adicionada até a mistura ficar rosa (pH 6,8-7,2). Para cada material assim preparado, uma gota foi desenhada e montada em uma lâmina para teste de BAAR usando coloração de Ziehl-Neelsen (ZN). Os materiais de amostra também foram semeados em tubos contendo meio líquido Middlebrook 7H9, específico para testes MGIT - um método que emprega um sensor fluorescente (rutênio pentahidratado em base de silicone) para detectar oxigênio liberado por micobactérias. Os tubos foram incubados a 37 °C em um sistema BD Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e monitorados automaticamente para resultados positivos ou negativos.

## 2.2 MÉTODO LJ: DESCONTAMINAÇÃO, SEMEADURA EM MEIO SÓLIDO E DETECÇÃO DE BAAR

As amostras foram descontaminadas usando um método de Petroff modificado, <sup>11</sup> processadas para preparação de lâminas conforme descrito para a abordagem MGIT e semeadas em meio LJ. Os tubos semeados foram incubados a  $36 \pm 1$  °C e manuseados manualmente semanalmente para inspeção.<sup>7</sup>

### 2.3 MÉTODO OK: DESCONTAMINAÇÃO, SEMEADURA EM MEIO SÓLIDO E DETECÇÃO DE BAAR

Amostras não processadas foram esfregadas em lâminas de vidro para investigação de BAAR usando coloração ZN. O material de amostra restante foi então descontaminado por imersão em NaOH 4% por 2 min. O excesso de NaOH foi removido pressionando o swab contra a parede do frasco, seguido de semeadura em meio OK (pH 6,4, ligeiramente ácido). Os tubos semeados foram incubados a  $36 \pm 1$  °C e manuseados manualmente, semanalmente, para inspeção.<sup>7</sup>

O crescimento da cultura foi avaliado quanto à morfologia da colônia (aparência e cor). Uma porção da área de crescimento foi usada para preparar uma lâmina corada com ZN e examinada para BAAR e fator de cordão.<sup>7</sup> Os materiais de amostra também foram submetidos a testes imunocromatográficos para detecção da proteína MPT64, que ocorre em *Mycobacterium tuberculosis* (SD Bioline Kit, Standard Diagnostics, Korea), mas não em micobactérias não tuberculosas.<sup>12</sup>

As amostras semeadas em meio líquido foram processadas no MGIT até se revelarem positivas. Quarenta e dois dias após a semeadura, o sistema automatizado marca todas as amostras negativas restantes. Para meios LJ e OK, as amostras que não mostram crescimento em 45 dias, são normalmente reincubadas por mais 15 dias,<sup>7</sup> mas todas as nossas culturas positivas cresceram em 45 dias. Na ausência de microrganismos com morfologia micobacteriana em um período de 60 dias, as culturas foram consideradas negativas. O crescimento bacteriano inconsistente com *M. tuberculosis* e a ausência de detecção da proteína MTP64 caracterizaram micobactéria não-tuberculosa (MNT).<sup>12</sup> As culturas que desenvolveram outros tipos de crescimento bacteriano ou fúngico foram consideradas contaminadas.<sup>7</sup>

Os resultados (positivos, negativos ou contaminados) foram tabulados para cada método e tipo de material. A precisão do método OK foi avaliada em relação ao LJ, MGIT e a associação LJ + MGIT. O software SPSS (v. 24.0) e a calculadora online Critical Appraisal: Diagnostic Test (desenvolvida por D. J. R. Hutchon) foram usados para a análise estatística. O teste do qui-quadrado com correção de Bonferroni foi empregado para as comparações de frequência, adotando-se nível de significância de 5%. A precisão foi avaliada conforme Griner *et al.*<sup>13</sup> O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (parecer 2856464).

#### 4 RESULTADOS

Do total de 347 amostras investigadas (Tabela 1), 330 foram semeadas em meio OK, 314 em LJ e 113 em MGIT (As diferenças nos números das amostras refletem a escassez sazonal de meios de cultura ou volumes de amostra muito baixos para semeadura em todos os três meios).

Tabela 1. Distribuição por tipo de amostra recebida para cultura de *Mycobacterium tuberculosis*. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

Tipo de material	n (%)
<b>Material Extrapulmonar</b>	
Líquido cérebro-espinhal	98 (28,2)
Medula óssea	71 (20,5)
Fragmentos de tecidos (não especificados)	58 (16,7)
Líquido pleural	21 (6,1)
Urina	16 (4,6)
Sangue	12 (3,5)
Linfonodos	6 (1,7)
Lavado gástrico	3 (0,9)
Líquido ascítico	3 (0,9)
Swab de material não especificado	1 (0,3)
<b>Subtotal</b>	<b>289 (83,3)</b>
<b>Material Pulmonar, exceto escarro</b>	
Lavado bronco-alveolar	24 (6,9)
Secreção traqueal	34 (9,8)
<b>Subtotal</b>	<b>58 (16,7)</b>
<b>Total</b>	<b>347 (100,0)</b>

A taxa de positividade foi mais alta para OK (9,7%) e a taxa de contaminação mais alta para LJ (11,5%) (Tabela 2).

Tabela 2. Culturas realizadas para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras extrapulmonares, lavado broncoalveolar e secreção traqueal. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

Resultado	Métodos de Cultivo		
	O-K n (%)	L-J n (%)	MGIT n (%)
Positivo	32 (9,7)	16 (5,1)	8 (7,1)
Negativo	266 (80,6)	262 (83,4)	99 (87,6)
Contaminado	32 (9,7)	36 (11,5)	6 (5,3)
<b>Total</b>	<b>330 (100)</b>	<b>314 (100)</b>	<b>113 (100)</b>

OK: Ogawa-Kudoh; LJ: Löwenstein-Jensen; MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube

Para cada método e tipo de amostra, as taxas de positividade foram submetidas ao teste do qui-quadrado com correção de Bonferroni ( $p > 0,05$ ), não revelando associações entre as técnicas (Tabela 3).

Tabela 3. Positividade das culturas de *Mycobacterium tuberculosis*, por tipo de amostra e método. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

<b>Tipo de material</b>	<b>MGIT</b> % (n/total)	<b>L-J</b> % (n/total)	<b>O-K</b> % (n/total)	<b>p</b>
<b>Material extrapulmonar</b>				
Líquido céfalo-espinhal	0,0 (0/52)	3,6 (3/83)	4,8 (4/84)	0,297
Swab de material não especificado	-	-	100,0 (1/1)	-
Medula óssea	0,0 (0/8)	0,0 (0/62)	0,0 (0/69)	-
Biópsia/Fragmentos de tecidos diversos	0,0 (0/4)	17,2 (6/42)	11,1 (5/41)	0,709
Líquido pleural	0,0 (0/7)	0,0 (0/17)	5,6 (1/18)	0,505
Urina	12,5 (1/8)	6,7 (1/15)	8,3 (1/12)	0,892
Sangue	-	0,0 (0/12)	0,0 (0/12)	-
Linfonodos	33,3 (1/3)	33,3 (1/3)	50,0 (2/4)	0,503
Lavado gástrico	-	0,0 (0/2)	0,0 (0/2)	-
Líquido ascítico	0,0 (0/2)	0,0 (0/3)	0,0 (0/3)	-
<b>Material pulmonar</b>				
Secreção traqueal	42,9 (6/14)	22,7 (5/22)	34,5 (10/29)	0,503
Lavado bronco-alveolar	0,0 (0/8)a	0,0 (0/16)a	36,4 (8/22)a	0,005

Valores de *p* no teste do qui-quadrado. Letras idênticas na mesma linha indicam ausência de diferença entre os métodos (teste do qui-quadrado com correção de Bonferroni).

O desempenho OK foi comparado com os outros dois métodos no que diz respeito à sensibilidade, especificidade, precisão, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. (Tabela 4).

Tabela 4. Precisão do método Ogawa-Kudoh (OK), em comparação com Löwenstein-Jensen (LJ), Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) e associação LJ + MGIT. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

<b>Método</b> <b>Índice/</b> <b>Método</b> <b>Referência</b>	<b>Sensibilidade</b> % (IC95%)	<b>Especificidade</b> % (IC95%)	<b>Acurácia</b> (%)	<b>Valor Preditivo</b> <b>Positivo (VPP)</b> % (IC 95%)	<b>Valor Preditivo</b> <b>Negativo (VPN)</b> % (IC 95%)
OK/MGIT (n=88)	75,00 (30,1 a 95,4)	100,00 (95,6 a 100,0)	98,86	100,00 (43,85 a 99,99)	98,82 (93,63 a 99,79)
OK/LJ (n=257)	57,14 (32,6 a 78,6)	96,30 (93,1 a 98,0)	94,16	47,06 (29,16 a 69,03)	97,50 (94,65 a 98,84)
OK/LJ + MGIT (n=298)	56,25 (33,2 a 76,9)	91,84 (88,1 a 94,5)	89,93	28,13 (15,56 a 45,37)	97,37 (94,66 a 98,71)

IC95% = intervalo de confiança de 95%

A precisão de OK (98,86%) foi semelhante à do MGIT. A concordância entre os métodos é descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Grau de concordância entre os métodos Ogawa – Kudoh (OK), Löwenstein – Jensen (LJ) e Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) em amostras pulmonares e extrapulmonares no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

<b>Pares (A vs B)</b>	<b>Total</b>	<b>A+/B+</b>	<b>A-/A-</b>	<b>A+/B-</b>	<b>A-/B+</b>	<b>Kappa</b>	<b>IC 95%</b>	<b>Força</b>
<b>OK vs LJ</b>	257	8	234	9	6	0,485	0,233-0,738	Moderada
<b>OK vs MGIT</b>	88	3	84	-	1	0,851	0,562-1,000	Quase Perfeita



---

LJ vs MGIT	89	2	85	1	1	0,655	0,182-1,000	Substancial
------------	----	---	----	---	---	-------	-------------	-------------

---

Categorias de valores de  $\kappa$ : ruim (<0,00); leve (0,00-0,20); razoável: (0,21-0,40); moderado (0,41-0,60); substancial (0,61-0,80); quase perfeito: (0,81-1,00).

## 5 DISCUSSÕES

Para reduzir os casos e óbitos por tuberculose, as populações vulneráveis devem ter maior acesso aos serviços de saúde,<sup>14</sup> e a disponibilidade de métodos diagnósticos para confirmar casos de suspeita clínica deve ser ampliada.<sup>2</sup>

No Brasil, a tuberculose extrapulmonar é menos frequente que a forma pulmonar, sendo, portanto, alvo secundário de programas nacionais de controle. No entanto, as taxas de tuberculose extrapulmonar aumentaram em todo o mundo, criando a necessidade de programas e recursos laboratoriais para melhorar o diagnóstico e os resultados do tratamento, especialmente em situações em que medidas de controle oportunas dependem de confirmação laboratorial rápida e precisa.<sup>15-18</sup>

Os países em desenvolvimento ficaram para trás no uso de tecnologia de ponta para o diagnóstico, e o combate a doenças como a tuberculose continua sendo um desafio.<sup>19</sup>

No Estado de Mato Grosso do Sul, a confirmação diagnóstica tem se baseado principalmente no processamento de MGIT, LJ e OK desde o final dos anos 1990, e em testes de diagnóstico rápido baseados em PCR desde 2014. No entanto, o teste rápido não pode ser aplicado a todos os tipos de amostras, nem dispensa a necessidade de cultura e teste de sensibilidade ao medicamento.<sup>5</sup>

As apresentações extrapulmonares (disseminadas ou não) são mais frequentes entre os indivíduos infectados pelo HIV, tornando mais prevalente o encaminhamento de casos suspeitos para serviços especializados ou de maior complexidade.<sup>4</sup>

Embora o método OK tenha sido relatado como sensível e específico para *M. tuberculosis* na detecção de doença pulmonar (amostras de escarro),<sup>19-21</sup> comparações de seu desempenho com a abordagem LJ (padrão ouro) permanecem escassas.<sup>22-24</sup>

No LACEN-MS, a abordagem OK tem se mostrado particularmente útil para o diagnóstico em minorias étnicas situadas remotamente, dado o baixo custo do método e facilidade de operação, sem comprometer a viabilidade micobacteriana na etapa de descontaminação. O método está disponível atualmente para cerca de 60% da população do Estado.<sup>25</sup>

Para atender às recomendações do Ministério da Saúde do Brasil, os procedimentos da cultura OK foram implantados em outros laboratórios do Estado. Essa

descentralização aumentou a confirmação diagnóstica para 48,8% dos casos notificados para a população indígena em 2001-2009<sup>26</sup> e para 55,0% e 81,8% para as populações carcerárias em 2007-2010 e 2011-2014, respectivamente.<sup>27</sup> Só recentemente o método foi sugerido para outras regiões do país, para expandir a cobertura diagnóstica das apresentações pulmonares.<sup>21</sup>

O diagnóstico confirmado por cultura se traduz em ganhos palpáveis na qualidade de vida, não só dos pacientes, mas também da comunidade, por agilizar a identificação e o tratamento de fontes bacilíferas, mesmo quando resistentes aos medicamentos.<sup>5,21</sup>

O baixo custo, estimado em US \$ 1,00 para cada tubo de meio de cultura, devido ao uso de glutamato de sódio em vez de asparagina, tem sido um fator determinante para o atual uso mais amplo do OK no Mato Grosso do Sul.<sup>28</sup>

Além disso, o meio de cultura conserva-se bem à temperatura ambiente, antes e depois da semeadura, facilitando o envio do meio para laboratórios remotos e o reenvio das culturas semeadas para o LACEN-MS. Os procedimentos de descontaminação são simples, dispensando a centrifugação e a necessidade de cabines de biossegurança. Nossos resultados revelaram uma taxa de contaminação de 9,7%, inferior ao limite recomendado de 10%<sup>29</sup> e semelhante à taxa encontrada para o processamento LJ e OK de amostras pulmonares e extrapulmonares no Equador.<sup>10</sup>

Apesar do sucesso no uso do OK para amostras pulmonares,<sup>28</sup> apenas dois estudos, com pequeno número de amostras (102 extrapulmonares, 33 pulmonares - lavado broncoalveolar) e restritos a um serviço especializado para pacientes com AIDS, foram publicados no Brasil.<sup>30-31</sup>

Um estudo com 685 amostras extrapulmonares paucibacilares (fezes, abscessos e outras fontes) realizado no Equador não encontrou diferença significativa ( $p = 0,668$ ) na capacidade diagnóstica entre LJ (88,2%) e OK (90,3%),<sup>10</sup> enquanto nossa comparação de três abordagens com amostras paucibacilares revelaram acurácia de 98,86% para OK, semelhante à obtida para o método MGIT, com concordância quase perfeita.

Ao reduzir o tempo de processamento, a abordagem OK produz o diagnóstico duas a três semanas antes dos outros métodos - uma vantagem crucial para os esforços de controle de doenças. Além disso, pode ser realizado com um volume de amostra muito menor: um oitavo da quantidade exigida por outros métodos.<sup>10,16,17,18</sup>

Em nossa prática, o tempo necessário para o isolamento do *M. tuberculosis* se mostrou significativamente menor com o método OK, produzindo 77% de positividade

em três semanas pós-incubação, em contraste com 6,1% para LJ, corroborando os achados de outro estudo.<sup>10</sup>

Em resumo, o método OK se mostrou preciso e específico para o diagnóstico de tuberculose em amostras paucibacilares e capaz de confirmar a doença com a mesma precisão dos métodos LJ e MGIT - características que o tornam adequado para uso na prática laboratorial de rotina em nível local e regional, particularmente onde os recursos são escassos.

Com base nas diretrizes da OMS, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda um tempo de espera de 60 dias para o crescimento micobacteriano, independentemente do tipo de amostra. No LACEN-MS, entretanto, nenhum crescimento micobacteriano foi observado além de 45 dias, permitindo que pacientes com amostras previamente negativas fossem diagnosticados definitivamente 15 dias antes, liberando o laboratório para armazenamento e processamento de novos lotes de amostras.

A amostra de conveniência empregada nesta investigação foi obtida por meio de nossos procedimentos de rotina laboratorial. As restrições de amostras muito pequenas para semeadura em todos os três meios de cultura e a indisponibilidade temporária do meio Middlebrook 7H9 foram frequentes no período de estudo. Esses fatores imprevisíveis são responsáveis pelas diferenças no número de amostras processadas por cada método, uma limitação que pode ser superada em estudos futuros. Essas deficiências, no entanto, não afetaram nossos achados para amostras extrapulmonares.

O processamento OK provou ser uma excelente ferramenta de diagnóstico para amostras paucibacilares de apresentações pulmonares e extrapulmonares suspeitas, minimizando os riscos relacionados ao tempo de armazenamento, transporte e preservação da amostra. Nossos resultados, assim como os obtidos por Franco-Sotomayor et al.,<sup>10</sup> apoiam a adoção do método por laboratórios remotos para fins de semeadura.

Acreditamos que a adoção desse método pode contribuir para o diagnóstico mais rápido dos casos suspeitos de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, minimizando as dificuldades enfrentadas pelos pacientes, a resistência aos fármacos<sup>32</sup> e promovendo uma redução significativa nas taxas de incidência e mortalidade associadas à doença em todo o mundo.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. WHO/Tb, 2020.
2. Denkinger CM, Kik SV, Cirillo DM, Casenghi M, Shinnick T, Weyer K, et al. Defining the needs for next generation assays for tuberculosis. *J Infect Dis.* 2015 Apr 1;211 Suppl 2(Suppl 2):S29-38.
3. World Health Organization. Systematic Screening for Active Tuberculosis: Principles and Recommendations. WHO, 2013.
4. Sulis G, Centis R, Sotgiu G, D'Ambrosio L, Pontali E, Spanevello A, et al. Recent developments in the diagnosis and management of tuberculosis. *NPJ Prim Care Respir Med.* 2016; 26:16078.
5. Brasil. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 364 p.
6. Lopes AJ, Capone D, Mogami, R, Tessarollo B, Cunha DL, Capone RD et al. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão RJ.* 2006; 15(4):253-61.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 436 p.
8. Pinto MFT, Steffen R, Entringer A, Costa ACC, Trajman A. Impacto orçamentário da incorporação do GeneXpert MTB/RIF para o diagnóstico da tuberculose pulmonar na perspectiva do Sistema Único de Saúde, Brasil, 2013-2017. *Cad. Saúde Pública,* 33(9), e 00214515.
9. Asmar S, Chatellier S, Mirande C, van Belkum A, Canard I et al. A Novel Solid Medium for Culturing Mycobacterium tuberculosis Isolates from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2566-9.
10. Franco-Sotomayor G, Rivera-Olivero IA, Leon-Benitez M, Uruchima-Campoverde SE, Cardenas-Franco G, Perdomo-Castro ME et al. Fast, Simple, and Cheap: the Kudoh-Ogawa Swab Method as an Alternative to the Petroff–Lowenstein-Jensen Method for Culturing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2020;58(4): e01424-19.
11. Pedro HSP, Nardi SMTT, Arroyo MGF, Maria IP, Goloni MRA, Ferrazoli L. Avaliação do desempenho dos meios de cultura Ogawa-Kudoh e MGITT M para isolamento de micobactérias. *BEPA* 2011; 8(91):5-13.
12. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Sugamoto T, Kato T, Kazumi Y et al. Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex. *BMC Infect Dis.* 2014;14:54.

13. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann Intern Med.* 1981; 94(4Pt2):557-92.
14. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2017.* WHO Press; 2017.
15. Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A, Johnson JL, Riley LW, Maciel EL. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infect Dis.* 2014;14(9):1-9.
16. Parsons LM, Somoskövi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):314-50. Review.
17. Alavi SM, Bakhtiyariniya P, Albagi A. Factors associated with delay in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 8(3).
18. Procop GW. Laboratory Diagnosis and Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis.* *Microbiol Spectr.* 2016;4(6). Review.
19. Takao EKH, Nocchi SR, Siqueira VLD, Cardoso MA, Peron MLD, Caleffi KR et al. Comparação de métodos de cultivo para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar. *Acta Sci. Health Sci.* 2005; 27(2):183-8.
20. Rodríguez DP, Castillo MC, Velásquez ML, García MO, Castillo HR, Ganoza EM. Comparación de los medios Ogawa y Löwenstein Jensen en el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. *Hospital Regional Docente de Trujillo, Perú. Rev Méd Vallejana.* 2007; 4(1):24-31.
21. Costa RR, Da Silva SF, Fochat RC, Macedo RL, Pereira TV, Silva MR et al. Comparison between Kudoh-Ogawa and modified Petroff techniques for mycobacteria cultivation in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Einstein(São Paulo)* 2018;16(2):AO4214.
22. Jaspe RC, Rojas YM, Flores LA, Sofia Toro E, Takiff H, de Waard JH. Evaluation of the Kudoh swab method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis* in rural areas. *Trop Med Int Health.* 2009;14(4):468-71.
23. Rivas C, Coitinho C, Dafond V, Corbo M, Baldjian M. Performance of the Ogawa-Kudoh method for isolation of mycobacteria in a laboratory with large-scale workload. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42(2):87-90.
24. Jobarteh T, Otu J, Gitteh E, Mendy F, Faal-Jawara TI, Ofori-Anyinam B et al. Evaluation of the Kudoh method for mycobacterial culture: Gambia experience. *Int J Mycobacteriol.* 2016; 5(supl.1):S166.
25. Cunha EAT, Marques M, Gonçalves TO. Benefícios advindos da técnica de Ogawa-kudoh para diagnóstico, controle e avaliação da tuberculose em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública de MS,* 2018;1(1):102-09. [cited 2020 May 20]. Available from: <http://revista.saude.ms.gov.br/index.php/rspms/article/view/20>

26. Basta PC, Marques M, Oliveira RL, Cunha EAT, Resende APC, Souza-Santos R. Desigualdades sociais e tuberculose: análise segundo raça/cor, Mato Grosso do Sul. *Rev. Saúde Públ.* 2013;47(5): 854-64.
27. Cunha EAT, Marques M, Evangelista MSN, Pompilio MA, Yassuda RTS, Souza AS. A diagnosis of pulmonary tuberculosis and drug resistance among inmates in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018; 51(3): 324-30.
28. Palaci M, Peres RL, Maia R, Cunha EA, Ribeiro MO, Lecco R et al. Contribution of the Ogawa-Kudoh swab culture method to the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17(6):782-6.
29. Organizacion Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Organizacion Panamericana de la Salud, 2008.
30. Boffo MMS, Mattos IG, Ribeiro MO, Jardim SV. Tuberculose extrapulmonar em pacientes com AIDS na cidade do Rio Grande, Brasil: diagnóstico laboratorial. *Rev Port Pneumol.* 2000;6(4):277-82.
31. Boffo MMS, Mattos IG, Ribeiro MO, Oliveira Neto IC. Tuberculose associada à AIDS: características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes atendidos em um serviço de referência do sul do Brasil. *J Bras Pneumol.* 2004;30(2):140-6.
32. Júnior ACV, Guedes DRS, Souza MS, Macedo CA, Medeiros RO, Alves HB, Neto HD, Silva DF. Avaliação do perfil epidemiológico da tuberculose e a sua coinfeção TB-HIV nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. *Braz. J. of Develop., Curitiba,* v. 6, n. 1, p.441-456 jan. 2020.