

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE OGAWA — KUDOH PARA O ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS

Andréa G. V. COELHO *
Liliana A. ZAMARIOLI *
Marilice P. VICENTE*
Regina Ruivo FERRO E SILVA**

RIALA 06/866

COELHO, A. G. V. et al. — Avaliação do método de Ogawa — Kudoh para o isolamento de micobactérias. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 57-61, 1999.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do método de descontaminação de Ogawa — Kudoh e a técnica de "swab" em meio de Ogawa (MOK), paralelamente à metodologia tradicional de Petroff em meio de Lowenstein — Jensen (MP) para o isolamento de micobactérias de espécimes clínicos de origem pulmonar e extrapulmonar. Foram analisadas 779 amostras de pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar e/ou micobacteriose. Destas, a positividade do MP foi de 13,96% e do MOK foi de 16,23% e a sensibilidade do MOK foi de 79% e a especificidade 94%. Observou-se ainda o crescimento das culturas mais rápido pelo MOK e uma menor contaminação. Pelos resultados obtidos, associados à simplicidade e baixo custo do método, o mesmo apresentou condições favoráveis de implantação na rotina laboratorial dos Laboratórios de Saúde Pública que apresentam escassos recursos humanos e materiais.

DESCRIPTORIOS: Micobactérias; Cultura; Método de Descontaminação

INTRODUÇÃO

O aumento de casos de tuberculose, principalmente a partir de 1980, em consequência do impacto de fatores demográficos como crescimento populacional e envelhecimento da população, e fatores epidemiológicos como os efeitos adversos do vírus da imunodeficiência humana (HIV), além da deterioração dos serviços de saúde em alguns países, exige providências imediatas no combate à esta epidemia.

Estima-se hoje a nível mundial, a ocorrência de 88 milhões de casos novos de tuberculose, dos quais oito milhões são devidos à coinfeção HIV — TB, com uma

previsão de incidência global de 163 / 100.000 habitantes para o ano 2.000⁵.

O Estado de São Paulo apresenta por ano, 7000 casos novos e 600 óbitos, sendo uma região onde a doença continua a apresentar um quadro alarmante.

O Programa de Controle da Tuberculose (PCT) apresenta como objetivos a detecção precoce de casos novos e o aumento efetivo do tratamento dos casos infectantes para quebra da cadeia de transmissão da infecção¹.

O método utilizado para o diagnóstico laboratorial da tuberculose é a bacilosopia, devido ao seu baixo custo e facilidade de execução⁹.

Apesar de contribuir para o PCT, esta técnica apresenta uma baixa sensibilidade, 22 a 49% menor do que a

* Instituto Adolfo Lutz — Laboratório I de Santos — Área de Micobactérias

** Instituto Adolfo Lutz — Laboratório I de Santo André — Área de Micobactérias

cultura, e impossibilita o isolamento da micobactéria, o que inviabiliza a identificação e o estudo da resistência frente aos atuais quimioterápicos ^{7,19}.

Os laboratórios mais especializados, como os da Rede Regional de Laboratórios de Tuberculose do Estado de São Paulo, além do exame direto, realizam a cultura, utilizando o método de Petroff (MP) para a digestão e descontaminação do escarro, com semeadura em meio Lowenstein — Jensen (LJ). Esta técnica laboratorial requer equipamentos específicos e área física maior para o seu desenvolvimento, o que reduz a sua utilização de maneira generalizada ^{8,12,16}.

Sendo assim, diante da necessidade de se ampliar a cobertura diagnóstica laboratorial da tuberculose pulmonar na Baixada Santista, com cinco municípios considerados prioritários no Plano de Ação Emergencial para o controle da tuberculose, elaborado pela Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária (CNPS) do Ministério da Saúde (Cubatão, Praia Grande, Guarujá, São Vicente e Santos) e na região do ABCD (Santo André, São Bernardo, São Caetano e Diadema) com três municípios prioritários (Diadema, Santo André e São Bernardo do Campo), avaliamos o método de descontaminação Ogawa-Kudoh ^{2,6,11,13,14,15,18}, que apresenta uma metodologia sensível, de fácil reprodutibilidade e de baixo custo, e que pode ser aplicada em laboratórios com escassos recursos materiais e humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas 779 espécimes clínicos, provenientes de 714 pacientes sintomáticos respiratórios e 65 de pacientes com suspeita de tuberculose extrapulmonar, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde da Baixada Santista e da região ABCD, no período de maio de 1996 a dezembro de 1997.

As amostras foram colhidas segundo as normas recomendadas pelo Manual de Bacteriologia da Tuberculose do Ministério da Saúde (MS).⁸

PROCEDIMENTOS BACTERIOLÓGICOS

Baciloscopia — foi realizado um esfregaço de cada espécime clínico e corado pelo método de Ziehl — Neelsen. No caso de lâmina positiva efetuou-se a contagem bacilar semi — quantitativa segundo o índice baciloscópico recomendado pelo MS ⁷.

Cultura — foi colocado um volume de aproximadamente 3 ml do espécime clínico em um tubo de polipropileno de fundo cônico; introduziu-se o “swab” estéril que, através de movimentos rotatórios foi impregnado com o material. Este “swab” foi transferido para um tubo 18x180mm contendo aproximadamente 2,0 ml de uma solução de hidróxido de sódio a 4% e incubou-se à temperatura ambiente por 2 minutos; em seguida processou-se a semeadura em dois tubos contendo meio de Ogawa modificado por Kudoh (MOK) ^{6,13}. O espécime clínico remanescente no tubo de polipropileno foi submetido à descontaminação pelo método de Petroff (MP) ¹⁶ e semeado em dois tubos contendo meio de Lowenstein — Jensen (LJ) ^{6,8,13,18}.

Os tubos foram incubados a 37 °C realizando-se a leitura dos mesmos na 1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas de incubação. Não havendo crescimento nos tubos após 60 dias, as culturas foram consideradas negativas. As culturas positivas foram identificadas de acordo com as técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde, observando-se o tempo de crescimento, pigmentação das colônias e realização de provas bioquímicas ^{3,4,8,10,20}.

RESULTADOS

A comparação entre os resultados das culturas processadas pelo MP e pelo MOK, encontram-se na Tabela 1. Ressaltamos que alguns critérios foram utilizados na

Tabela 1. Comparação entre os resultados positivos e negativos de culturas processadas pelas técnicas de descontaminação Petroff e Ogawa — Kudoh

		Técnica de Petroff		Total
		Positivo	Negativo	
Técnica de Ogawa-Kudoh	Positivo	78	36	114
	Negativo	20	568	588
Total		98	604	702

comparação das duas técnicas:- amostras contaminadas no MP ou no MOK foram excluídas de nossos resultados; — todas as amostras positivas no MOK em combinação com o MP foram consideradas verdadeiras positivas ; — todas as amostras positivas somente pelo MOK foram consideradas para estudo da sensibilidade e especificidade do método, falso positivas.

Efetuada-se cálculos estatísticos para a determinação dos valores de concordância entre os métodos obtive-se: 92% de concordância bruta, 74,3% concordância esperada e 69% de concordância ajustada (Kappa).

Analisamos a expressão de crescimento da micobactéria nos dois métodos em relação ao tempo, representado em dias (Figura 1).

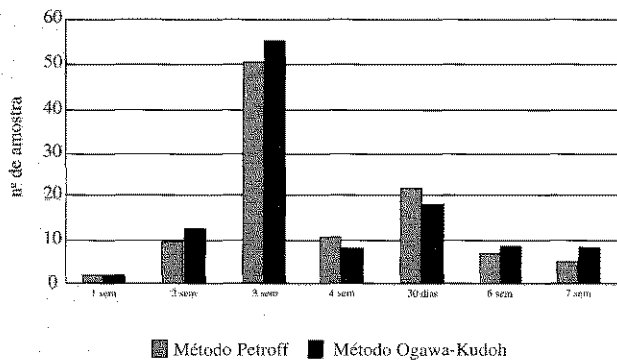


Figura 1 — Comparativo entre o tempo de crescimento das culturas, dos espécimes clínicos positivos, processados pelos Métodos de Ogawa — Kudoh e Petroff.

Comparando-se os dados da Tabela 2, verifica-se que os resultados obtidos pelos dois métodos são semelhantes no que se refere a positividade e mostra um maior índice de contaminação no método de Petroff. Na tabela 3 observamos as espécies isoladas em ambos os métodos.

Tabela 2. Positividade e contaminação das amostras processadas pelo Método de Petroff e Método de Ogawa — Kudoh

	n de amostras	Petroff		Ogawa-Kudoh	
		nº	%	nº	%
Contaminação	779	47	6	29	3,70
Positividade	702	98	13,96	114	16,24

Tabela 3. Espécies Isoladas nas culturas positivas pelo método de Petroff e método de Ogawa-Kudoh

	Método de Petroff		Método Ogawa-Kudoh	
	N	%	N	%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	89	90,8	98	85,9
<i>Mycobacterium avium</i>	03	3,1	06	5,3
<i>Mycobacterium kansasii</i>	04	4,1	07	6,1
<i>Mycobacterium szulgai</i>	01	1,0	01	0,9
<i>Mycobacterium terrae</i>	01	1,0	01	0,9
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	00	00	01	0,9
Total	98	100	114	100

DISCUSSÃO

A baciloscopia, representa o principal recurso diagnóstico da tuberculose, por demonstrar a presença do agente etiológico da doença e identificar os casos bacilíferos para serem tratados, acrescido de seu baixo custo e simplicidade. As limitações desta técnica⁶ contudo, demandam a execução da cultura, uma vez que esta permite aumentar a cobertura diagnóstica além de possibilitar a realização de estudos sobre resistência, virulência e outras características do bacilo necessárias à avaliação e adoção de medidas para o controle da enfermidade.

Os instrumentos utilizados para o diagnóstico podem ser avaliados com base na sensibilidade, especificidade e custos . Para ser considerado adequado, o instrumento deve ter um nível aceitável de sensibilidade, especificidade e uma estimativa de custos que varia e serve de guia geral para a seleção do instrumento diagnóstico¹².

No Brasil, pelas normas recomendadas pelo PCT recorre-se e restringe-se à técnica de Petroff com semeadura em LJ a apenas determinados casos⁸. Sendo assim, ainda que se faça necessária a realização da cultura de maneira ampla como a baciloscopia, encontram-se sérios impedimentos na utilização desse método em nosso país, devido a sua complexidade técnica e custos, os quais tornam inacessíveis aos Laboratórios e Regiões com escassos recursos materiais e humanos.

Verificamos que a técnica simplificada descrita por Kudoh & Kudoh, revelou resultados compatíveis com os já apresentados por outros autores como OROZCO VARGAS e colaboradores^{1,6,13,18}, reforçando a idéia que a técnica simplificada MOK pode substituir o MP sem prejuízos para a busca de casos no PCT, ampliando dessa maneira a cobertura diagnóstica².

A comparação entre os métodos revelou-nos, um índice de crescimento micobacteriano maior e mais rápido no MOK, talvez devido a uma melhor distribuição bacilar na superfície do meio através do processo de semeadura com "swabs", com a vantagem de uma menor contaminação e, satisfatória taxa de sensibilidade (79%) e especificidade (94%).

Devemos destacar, além dos aspectos descritos, outras vantagens oferecidas pelo método, como:

- O procedimento de descontaminação é simples e rápido, não necessitando de equipamentos e pessoal técnico especializado;
- A manipulação reduzida da amostra e a não utilização de mecanismos de agitação / centrifugação, favorece a execução da técnica em labora-

tórios de menor complexidade, reduzindo a produção de aerossóis e, conseqüentemente, a contaminação ambiental e do pessoal de laboratório; — Após semeado o meio pode ser mantido à temperatura ambiente por até 20 dias, aguardando seu envio ao Laboratório Regional para ser incubado.

Finalmente devemos referir que, mesmo não sendo um método recomendado pelo Ministério da Saúde, apresenta vantagens e condições favoráveis de implantação e aplicabilidade na rotina dos laboratórios com escassos recursos humanos e materiais.

AGRADECIMENTO

À Oficial de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica, Teresa de Ávila Ribeiro Figueiredo, e à Auxiliar de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica, Francisca Carrenho de Oliveira.

RIALA 06/866

COELHO, A. G. V. et al. -Evaluation of the Ogawa — Kudoh method for the isolation of mycobacteria. Rev. Instituto Adolfo Lutz, 58(2): 57-61, 1999

ABSTRACT: The purpose of this study was to evaluate the performance of the Ogawa — Kudoh decontamination and the Swab technique in Ogawa medium (OKM) compared to the traditional Petroff Methodology (PM) in Lowenstein — Jensen medium for the isolation of mycobacteria from pulmonary and extra-pulmonary clinical specimens. 779 samples from patients with clinical symptoms of pulmonary tuberculosis and/or mycobacterioses were studied. The positivity of PM and OKM was 13,96% and 16,24%, respectively. OKM showed a sensitivity of 79% and a specificity of 94%. It was also observed a faster culture growth in OKM, and a lower contamination rate. According to the results obtained, simplicity and low cost of the method, we believe that it might be implanted as a routine method in Public Health Laboratory which usually present scarce human and material resources.

KEY WORDS: Mycobacteria; Culture; Decontamination method

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. — FNG/ CENEPI/ CNPS/ Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Boletim de Pneumologia Sanitária. X Conferência Nacional de Saúde, 1996. Vol.04.
2. FILHO, A. F. — *Emprego da Técnica de cultura simplificada de Kudoh & Kudoh (1974) para diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar em Saúde Pública*. São Paulo, 1996 (Tese de doutorado, Faculdade de Saúde Pública da USP).
3. JAPAN. — Mycobacterioses Research Laboratory of the National Chubu Hospital Obu, Aichi 474. Tsukamura, M. *Identification on Mycobacteria*, 1984.
4. KENT, P.T. & KUBICA, G. P. — *Identification test techniques*. In: Public Health Mycobacteriology A guide for the Level III Laboratory. Centers for Control, Atlanta, p. 207, 1985.

5. KOCHI, A. ; DOLIN, P. J.; RAVIGLIONE, M.C. — Global tuberculosis incidence and mortality during 1990- 2000. *Bull Who*, 72 (21): 213 — 220, 1994
6. KUDOH, S. & KUDOH, T. — A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull Who*, 51 : 71 — 82, 1974.
7. LEVY, U.; FELDMAN, C.; SAEHO, U.; VAN DER MOULEN, H. ; KALLENBACH, J.; KOORNHOF, H. — A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnoses of pulmonary tuberculosis. *Chest*, 95 : 1193 — 1197, 1989.
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose . Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2ª ed. Rio de Janeiro. Fundação Nacional da Saúde, 1994.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose . Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 1980.
10. MITCHISON, D. A . — Bacteriology of tuberculosis. *Trop. Doct.*, 4: 147 — 143, 1974.
11. NASSAU, E. — Sputum swab culture: Simple method of isolation tubercle bacilli from sputum. *Tubercle*, 39: 18 — 23, 1958.
12. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD — Control de la tuberculosis. Manual sobre métodos y procedimientos para los programas integrados. Washington, Organizacion Panamericana de la Salud, 1987.
13. OROZCO, L. C.; FRANCO, C. I. L.; BLANCO, E.G.; RAMOS, O .Q.; MORENO, A. I. U.- El cultivo de Esputo para el Diagnostico de la tuberculosis Pulmonar. *Biomédica*, 5 (1-2): 24 — 25, 1985.
14. OROZCO, L.C.; FRANCO, C.I.L.; BLANCO, E.G.; RAMOS, O .Q.; MORENO, A .I.U.- Uma modificacion al méodo de Kudoh para el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica*, 5 : 86 — 89, 1985.
15. OROZCO, L.C.; FRANCO, C.I.L.; RIVIERA, M.B. — El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar por cultivo de esputo en unidades de salud com recursos mínimos. *Biomédica*, 7: 35 — 36, 1987.
16. PETROFF, S. A . — A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle de bacilli directly from sputum and feces. *J. Exp. Med.*, 21:38, 1915.
17. RUFFINO, A. N. — Avaliação do excesso de casos de tuberculose atribuídos a infecção HIV / AIDS: ensaio preliminar. *Revista de Saúde Pública*, 29 (4): 279 — 282, 1995.
18. SUSEMIHL, M. A. A. de M. M. ; FERRAZO-LLI, L.; UEKI, S.Y.M.; GIMENEZ, D.G.; PALLACI, M. — Avaliação do Método Ogawa — Kudoh para o cultivo de micobactérias. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, 29 : 51 — 54, 1993.
19. TRIVELLATO, L.B. & FERNANDES, L.C. — Avaliação da eficiência dos dois métodos baciloscópicos no diagnóstico dos B.A .A .R., utilizando-se como padrão a cultura de escarro. *Revista Med.*, São Paulo, 19 (1): 1 — 4, 1986.
20. YATES, M.D.; POZNIAK, A.; GRANGE, J.M. — Isolation of Mycobacteria from patients seropositive for the human immunodeficiency virus (HIV) in South East England 1984-92. *Thorax*, 49: 990 — 995, 1993.

Recebido para publicação 04/03/1999

