

# Artigo Original

## Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis*\*

Detection of cord factor for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex

Andrea Gobetti Vieira Coelho<sup>1</sup>, Liliana Aparecida Zamarioli<sup>2</sup>,  
Clemira Martins Pereira Vidal Reis<sup>3</sup>, Bruno Francisco de Lima Duca<sup>4</sup>

### Resumo

**Objetivo:** O *Mycobacterium tuberculosis*, sob certas condições apropriadas, cresce em cordões de serpentinas, denominados de fator corda, ou crescimento em cordas. O objetivo deste estudo é avaliar a detecção do fator corda como método de identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis*, comparando-o aos testes de tipificação (TIP) convencionais. **Método:** Foram analisadas 743 cepas, de janeiro de 2002 a dezembro de 2005, na Área de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz - Santos, obtidas de isolados clínicos coletados de pacientes sintomáticos respiratórios ou com suspeita clínica de tuberculose pulmonar e/ou micobacterioses, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde da Baixada Santista. Foram feitos esfregaços das cepas de micobactérias isoladas em meio líquido MB/BacT e meio sólido, Lowenstein-Jensen ou Ogawa-Kudoh, sendo 301 (40,5%) cepas em meio líquido e 442 (59,5%) em meio sólido. **Resultados:** Os resultados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos, obtidos com a comparação do desempenho do método em ambos os meios de isolamento e TIP convencionais, foram respectivamente 98,5, 88, 97 e 93%. Observou-se maior sensibilidade do método em meio sólido (100%), com uma diferença de sensibilidade entre os meios analisados de apenas 2,7%. **Conclusões:** Conclui-se, pelos resultados obtidos, que o fator corda é um critério real e rápido na identificação do complexo *M. tuberculosis*; além disso, em laboratórios com alta prevalência do complexo *M. tuberculosis* e que não dispõem de técnicas que permitam a precocidade de sua identificação, o fator corda possibilita o direcionamento aos testes conclusivos de identificação e adicionais de sensibilidade que se façam necessários.

**Descritores:** Técnicas e procedimentos de laboratório; *Mycobacterium tuberculosis*; Fatores Cord.

### Abstract

**Objective:** Virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, under certain appropriate conditions, grow as characteristic ropes, bundles or serpentine cords known as cord factor or growth in cords. The objective of the present study was to evaluate cord factor detection as a method of achieving presumptive identification of the *M. tuberculosis* complex, comparing it to conventional typing tests. **Methods:** A total of 743 strains were analyzed from January of 2002 to December of 2005 in the Mycobacteria Sector of the Adolfo Lutz Institute, located in the city of Santos, Brazil. Samples were obtained from clinical specimens collected from patients with respiratory symptoms treated at basic health clinics in the greater metropolitan area of Santos. Ziehl-Neelsen-stained smears were prepared, 301 (40.5%) in MB/BacT broth and 442 (59.5%) on solid media, either Lowenstein-Jensen or Ogawa-Kudoh. **Results:** The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value obtained during the performance comparison of the two methods (cord factor detection and conventional typing) using both isolation media were, respectively, 98.5, 88, 97 and 93%. The method was more sensitive on solid medium (100%), and the difference in sensitivity between the two media types was only 2.7%. **Conclusions:** Taking into consideration the results obtained, we conclude that, in laboratories with a high incidence of *M. tuberculosis* complex isolation and limited economic resources, cord factor detection is a fast and valid criterion for identifying these mycobacteria using liquid or solid medium. It also enables subsequent conclusive identification tests, as well as additional sensitivity tests when necessary.

**Keywords:** Laboratory techniques and procedures; *Mycobacterium tuberculosis*; Cord factors.

\* Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

1. Assistente Técnico à Pesquisa Científica e Tecnológica. Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

2. Pesquisador Científico. Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

3. Técnico de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica. Laboratório Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

4. Farmacêutico. Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

Endereço para correspondência: Andréa Gobetti Vieira Coelho. Rua Oswaldo Cruz, 67/94, Boqueirão, CEP 11045-101, Santos, SP, Brasil.

Tel 55 13 3232-5112. Fax 55 13 3222-3151. E-mail: dea\_gobetti@hotmail.com

Recebido para publicação em 25/1/2007. Aprovado, após revisão, em 16/4/2007.

## Introdução

A tuberculose (TB) é uma das enfermidades mais antigas, com ampla distribuição geográfica, constituindo um sério problema de saúde pública no mundo e no Brasil.<sup>(1)</sup> Ocorre em países desenvolvidos ou de economias emergentes, mas que expõem contrastes profundos de desenvolvimento, e está associada a altos indicadores de pobreza, destacando-se na agenda de prioridades nos países em desenvolvimento.<sup>(2)</sup>

Seu agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis*, e a forma clínica mais comum é a pulmonar. A via de transmissão mais freqüente é o contato pessoa a pessoa, a partir de uma fonte de infecção com lesões pulmonares.<sup>(3)</sup>

Segundo estimativas realizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB é responsável por 2,7 milhões de mortes anuais, 95% das quais em países em desenvolvimento. Projeções feitas em 1995 indicam que, até o ano de 2005, ocorrerão 11,9 milhões de casos novos da doença anualmente. O Brasil ocupa o 16º lugar entre os países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo,<sup>(4,5)</sup> apresenta o maior número de casos da América Latina,<sup>(6)</sup> e está entre os 22 países considerados prioritários pela OMS,<sup>(7)</sup> com uma taxa de incidência de 60 por 100.000 habitantes e 7,8 de mortalidade.<sup>(5)</sup>

O Estado de São Paulo notifica anualmente cerca de 21.000 casos, sendo, em números absolutos, o maior contingente de casos do Brasil. Em 2005, a incidência de TB no Estado de São Paulo foi de 43,9 casos por 100.000 habitantes; não foi a maior do Brasil, mas situa-se próxima à média nacional que, em 2004, foi de 44,1 por 100.000 habitantes. Dos 645 municípios que compõem o Estado de São Paulo, dez concentram 53% dos casos novos.<sup>(8)</sup>

A Região Metropolitana da Baixada Santista, localizada no litoral paulista do Estado de São Paulo, é a terceira região mais populosa do estado, com cerca de 1.500.000 de pessoas distribuídas em nove municípios, na qual situam-se 8 dos 73 municípios prioritários para o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT). Em 2002, 2003 e 2004, a incidência de TB na Baixada Santista foi de 95,2, 99,2 e 94,9/100.000 habitantes, respectivamente.<sup>(8,9)</sup> Frente ao atual quadro epidemiológico desta enfermidade, o diagnóstico rápido das micobacterioses é um desafio constante do PNCT.

Em conseqüência do glicolípido dimicolato de trealose, presente na parede da célula bacteriana, e em condições apropriadas, nota-se, nas cepas virulentas do bacilo da TB, o crescimento do complexo *M. tuberculosis* em cordas serpentiformes microscópicas, denominadas de fator corda, ou crescimento em cordas, nas quais os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) estão dispostos em cadeias paralelas.<sup>(10)</sup> Estudos têm avaliado a utilização do fator corda em meio líquido como um resultado presuntivo confiável para a identificação rápida e precoce do complexo *M. tuberculosis*, em laboratórios que utilizam a metodologia automatizada no isolamento das micobactérias.<sup>(11)</sup>

O método tem sido utilizado, ainda, como triagem, na identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis*, juntamente com a avaliação da morfologia colonial em meio sólido, possibilitando um direcionamento prático e de baixo custo aos testes adicionais de identificação ou sensibilidade que serão necessários.<sup>(11,12)</sup>

Diante dessa realidade, e na qualidade de Laboratório Regional, realizamos este estudo com o objetivo de avaliar a presença do fator corda como identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis*, utilizando cepas de micobacté-

**Tabela 1** – Comparação do resultado presuntivo do fator corda e testes de tipificação convencionais de 743 cepas, analisadas no período de 2002-2005.

Identificação presuntiva	nº culturas	TIP convencional <sup>a</sup>			
		Complexo Mtb		MNT	
		ML (nº/%)	MS (nº/%)	ML (nº/%)	MS(nº/%)
FC positivo (complexo <i>M. tuberculosis</i> )	608 (82%)	336 (56%)	255 (42,5%)	12 (8,4%)	05 (3,6%)
FC negativo (MNT)	135 (18%)	09 (1,5%)	00 (-)	85 (59%)	41 (29%)
Total	743 (100%)	600 (100%)		143 (100%)	

<sup>a</sup>Resultados obtidos a partir dos testes de Gen-Probe (sondas de DNA), análise morfológica de crescimento e demais métodos bioquímicos tradicionais. Complexo Mtb: complexo *Mycobacterium tuberculosis*; FC: fator corda; ML: meio de isolamento líquido; MNT: micobactérias não tuberculosas; MS: meio de isolamento sólido; e TIP: teste de tipificação.

rias isoladas em meio líquido MB/BacT e sólido, Lowenstein-Jensen ou Ogawa-Kudoh. Pretende-se demonstrar que este método rápido, fácil, sensível e de baixo custo, pode ser realizado com segurança em nosso Laboratório e nos laboratórios locais da região que utilizam o isolamento de micobactérias em meio sólido.

## Métodos

Este estudo foi realizado a partir da análise do acervo de 743 cepas de micobactérias (2002-2005) sendo 301 (40,5%) cepas em meio líquido e 442 (59,5%) em meio sólido, isoladas de espécimes clínicos coletados de pacientes sintomáticos respiratórios ou com suspeita clínica de TB pulmonar e/ou micobacterioses, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde da Baixada Santista, segundo técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde.<sup>(13)</sup>

Realizou-se um esfregaço direto de cada cepa, a partir do meio de isolamento, e o mesmo foi corado pelo método de Ziehl-Neelsen, segundo o Manual de Bacteriologia da Tuberculose<sup>(13)</sup>:

- esfregaço de cepa em meio líquido: realizado diretamente em lâmina, a partir do sedimento obtido da centrifugação de 5 mL em meio líquido.
- esfregaço de cepa em meio sólido: realizado diretamente em lâmina com água destilada estéril, a partir de uma alçada da cepa isolada.

As lâminas foram analisadas, e a presença de BAAR e formação do fator corda foram anotadas.

A identificação da cepa como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* foi confirmada pela análise dos registros dos resultados dos testes de

tipificação convencionais já realizados anteriormente, nos quais a cepa foi submetida ao teste de Gen-Probe (sondas de DNA), análise morfológica de crescimento e demais métodos bioquímicos tradicionais.<sup>(14,15)</sup>

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz.

## Resultados

A prevalência de espécies de micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* no período em estudo (2002-2005) foi de 81%; assim, a identificação presuntiva dessa espécie é importante recurso diagnóstico.

A partir dos resultados obtidos das 743 cepas analisadas foi realizada a verificação da sensibilidade, especificidade, bem como o valor preditivo, positivo e negativo, da presença do fator corda na identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis* em meio líquido e sólido, frente aos testes de tipificação convencionais. Para tal, dividimos essa análise em três etapas: avaliação do fator corda em meio líquido, em meio sólido e, por último, o desempenho do método frente ao total de cepas analisadas (Tabela 1).

Em meio líquido, o fator corda na identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis* apresentou a sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos de 97,3, 87,6, 96,5 e 90,4%, respectivamente; em meio sólido, demonstrou 100% de sensibilidade, e 89% de especificidade, com valores preditivos positivos e negativos de 98 e 100%, respectivamente.

**Tabela 2** – Espécies isoladas de 743 cepas, analisadas segundo o resultado da identificação presuntiva do fator corda, no período de 2002-2005.

Espécies isoladas	nº cepas	MS		ML	
		FC+	FC-	FC +	FC-
Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	600	255	00	336	09
<i>M. kansasii</i>	50	02	12	09	27
Complexo <i>M. avium</i>	11	00	4	00	7
<i>M. fortuitum</i>	22	03	03	01	15
Outras	60	00	22	02	36
Total	743 (100%)	260 (86,4%)	41 (13,6%)	348 (78,7%)	94 (21,3%)
		301		442	

FC+: fator corda positivo; FC-: fator corda negativo; MS: meio de isolamento sólido; e ML: meio de isolamento líquido.

Nas Figuras 1 e 2, podemos observar a imagem microscópica do *M. tuberculosis* e *M. kansasii* em ambos os meios de isolamento.

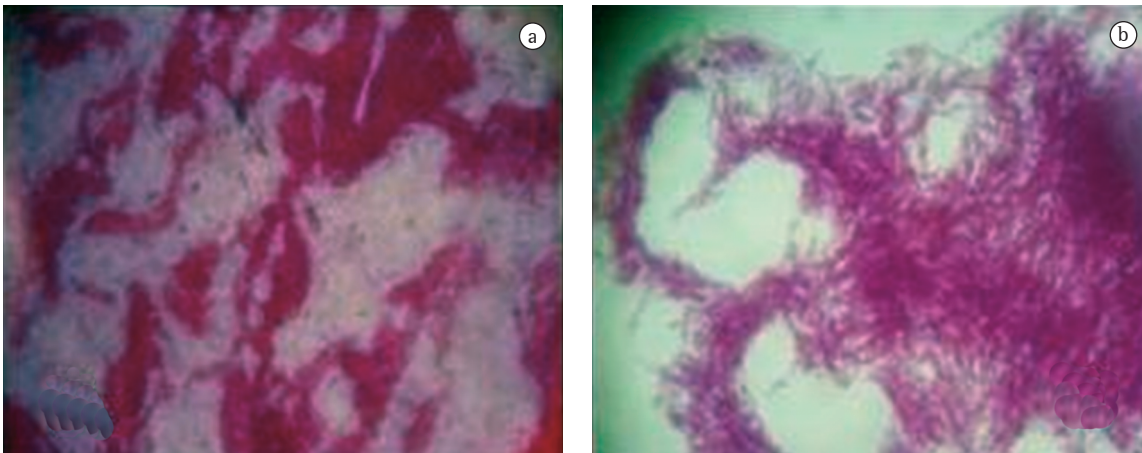
Na comparação do desempenho do método em ambos os meios de isolamento e na identificação final com testes de tipificação convencionais, os resultados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos obtidos foram respectivamente 98,5, 88, 97 e 93%.

Das 743 cepas estudadas, 608 (81,8%) foram identificadas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* pela presença do fator corda; destas, 591 (97,2%) foram confirmadas pelos testes de tipificação convencionais e 17 (2,8%) foram identificadas como micobactérias não tuberculosas (MNT).

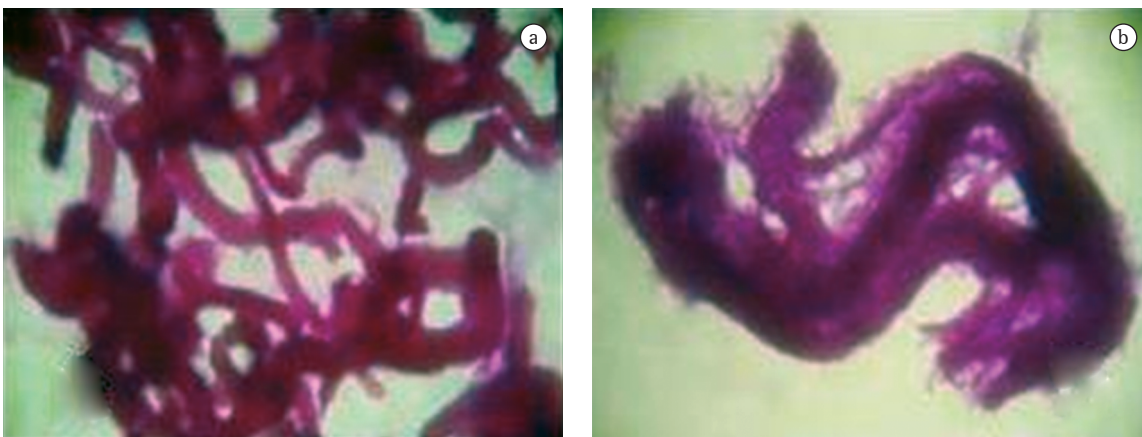
As espécies identificadas a partir dos métodos convencionais, isoladas em meio líquido e sólido, relacionadas quanto à presença ou ausência do fator corda, podem ser verificadas na Tabela 2.

## Discussão

Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo encontrado em nossa análise estão próximos aos já descritos em literatura.<sup>(16)</sup> Outros autores,<sup>(17)</sup> ao examinarem o fator corda como resultado presuntivo do complexo *M. tuberculosis* isolados em meio líquido, apontam 90% de sensibilidade, número esse próximo ao obtido em nosso estudo.



**Figura 1** - *Mycobacterium kansasii*, coloração de Ziehl-Neelsen, microscópio óptico (aumento 1600x): a) em meio líquido de isolamento, ausência de fator corda; e b) em meio sólido de isolamento, ausência de fator corda.



**Figura 2** - *Mycobacterium tuberculosis*, coloração de Ziehl-Neelsen, microscópio óptico (aumento 1600x): a) em meio líquido de isolamento, presença de fator corda; e b) em meio sólido de isolamento, presença de fator corda.

É possível a observação do fator corda em MNT, pois estas produzem 'pseudocordas', isto é, crescimento em cordas incompleto, onde a interpretação dependerá da experiência técnica (Figura 1). Do total de cepas analisadas, 17 MNT (12%) foram descritas como fator corda positivo, sendo 53% dessas identificadas como *M. kansasii*. Esses números são considerados elevados quando comparados aos de outros autores;<sup>(11,16)</sup> porém, ressaltamos que tais estudos não revelam o isolamento de *M. kansasii*, além de serem em menor proporção (16,9%) que os apresentados por conhecido autor.<sup>(12)</sup>

Ao analisar o desempenho do método em ambos os meios de isolamento, tivemos apenas 1,5% das cepas do complexo *M. tuberculosis* identificadas como fator corda negativo, sendo 100% em meio líquido. Tais diferenças mostram-se insignificantes e são menores que as apresentadas por outros autores, de aproximadamente 10%.<sup>(12,17)</sup>

A sensibilidade do método mostrou-se maior em meio sólido. Encontramos apenas 2,7% de diferença de sensibilidade ao analisar o método em ambos os meios de isolamento, número bastante relevante, uma vez que a maioria dos Laboratórios de Saúde Pública do Brasil utilizam o meio sólido no isolamento de micobactérias, confirmando a viabilidade deste método.

Efetuada-se cálculos estatísticos para determinação dos valores de concordância entre os métodos, observou-se: 96% de concordância bruta, 69% de concordância esperada e 87% de concordância ajustada (kappa).

Com base nos resultados dos valores preditivos positivos e negativos deste estudo, podemos concluir que o crescimento em cordas é um critério real e rápido na identificação do complexo *M. tuberculosis* isolado em meio líquido e sólido, possibilitando um direcionamento aos testes conclusivos de identificação e adicionais de sensibilidade que se fizerem necessários, em laboratórios com alta prevalência do *M. tuberculosis* e que não dispõem de técnicas que permitam a precocidade de sua identificação.

## Referências

1. Rosemberg J. Tuberculose. Panorama global. Óbices para seu controle. 2nd ed. Fortaleza: Secretaria de Estado da Saúde do Ceará; 1999.
2. Hijjar MA, Oliveira MJPR, Teixeira GM. A tuberculose no Brasil e no mundo. Bol Pneumol Sanit. 2001; 9(2):9-15.
3. Murray CJL, Styblo K, Rouillon A. Tuberculosis. In: Jamison DT. Disease control priorities in developing countries. Oxford: Oxford Medical Publication. Oxford University press; 1993. p. 233-59.
4. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de Tuberculose. Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. J Bras Pneumol. 2004;30(1):S1-S55.
5. World Health Organization. Global tuberculosis control surveillance, planning, financing: WHO report 2003. Geneva; WHO/TB; 2003. p. 1-316.
6. Santos Filho ET. Política de TB no Brasil: Uma Perspectiva da Sociedade Civil – Tempos de Mudanças para o Controle da Tuberculose no Brasil. Rio de Janeiro: Open Society Institute; 2006. p. 85.
7. Natal S. Emergência da resistência às drogas. Bol Pneumol Sanit. 2002. 10(2):57-70.
8. Tuberculose no Estado de São Paulo: Indicadores de Morbimortalidade e Indicadores de Desempenho. Bol Epidemiol Paulista 2006; 3(Supl 4):S1-S3.
9. Sistema estadual de Análise de Dados – SEADE [homepage on the Internet]. São Paulo: Fundação SEADE [cited 2005 Apr 05]. Available from: <http://www.seade.gov.br>
10. Levinson W, Jawetz E. Microbiologia médica e imunologia. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 631.
11. Badak FZ, Goksel S, Sertoz R, Guzelant A, Kizirgil A, Bilgic A. Cord formation in MB/BacT medium is a reliable criterion for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in laboratories with high prevalence of *M. tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1999;37(12):4189-91.
12. Monteiro PHT, Martins MC, Ueki SYM, Giampaglia CMS, Telles MAS. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Braz J Microbiol. 2003;34(2):171-4.
13. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Helio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2nd ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1994.
14. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis bacteriology: organization and practice. 2nd ed. London: Butterworth-Heinemann; 1997. p. 139.
15. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology - a guide for level III laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control, US Department of Health and Public Services, 1985. p. 207.
16. McCarter YS, Ratkiewicz IN, Robinson A. Cord formation in BACTEC medium is a reliable, rapid method for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 1998; 36(9):2769-71.
17. Yagupsky PV, Kaminski DA, Palmer KM, Nolte FS. Cord formation in BACTEC 7H12 medium for rapid, presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 1990; 28(6):1451-3.