

**ROBERTO SILVA**

**DETECÇÃO DO FATOR CORDA: UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES  
METODOLOGIAS COM E SEM COLORAÇÃO PARA UMA RÁPIDA  
IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DO COMPLEXO *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS***

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECTOLOGIA E  
MEDICINA TROPICAL  
BELO HORIZONTE – MG**

**2012**

**ROBERTO SILVA**

**DETECÇÃO DO FATOR CORDA: UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES  
METODOLOGIAS COM E SEM COLORAÇÃO PARA UMA RÁPIDA  
IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DO COMPLEXO *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde (área de concentração em Infectologia e Medicina Tropical).

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Silvana Spindola de Miranda  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Wânia da Silva Carvalho

**Belo Horizonte  
2012**

S586D Silva, Roberto  
Detecção do fator corda [manuscrito]: utilização de diferentes metodologias com e sem coloração para uma rápida identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. / Roberto Silva. - - Belo Horizonte: 2012.  
50f: il.  
Orientadora: Silvana Spíndola de Miranda  
Co-Orientadora: Wânia da Silva Carvalho.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Tuberculose. 2. Fatores Corda. 3. *Mycobacterium tuberculosis*. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Miranda, Silvana Spindola de. II. Carvalho, Wânia da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WF 200

# FOLHA DE APROVAÇÃO



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 34099640 FAX: (31) 34099641



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ROBERTO SILVA, nº de registro 2011656138. Às quatorze horas do dia vinte e nove de junho de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: "DETECÇÃO DO FATOR CORDA: UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS COM E SEM COLORAÇÃO PARA UMA RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DO COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Silvana Spindola de Miranda, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

CONFERE ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG

Pröfa. Silvana Spindola de Miranda/ orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>ARQUIVO</u>
Pröfa. Wania da Silva Carvalho/ coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Rodolfo de Braga Almeida	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Profa. Micheline Rosa Silveira	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado: ARQUIVO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de junho de 2012.

Profa. Silvana Spindola de Miranda/ orientadora Silvana Spindola de Miranda  
Profa. Wania da Silva Carvalho/ coorientadora Wania da Silva Carvalho  
Prof. Rodolfo de Braga Almeida Rodolfo de Braga Almeida  
Profa. Micheline Rosa Silveira Micheline Rosa Silveira  
Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior/Coordenador Vandack Alencar Nobre Jr.

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Infectologia e Medicina Tropical  
Faculdade de Medicina - UFMG



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



### DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores Silvana Spíndola de Miranda, Wania da Silva Carvalho, Rodolfo de Braga Almeida e Micheline Rosa Silveira, aprovou a defesa de dissertação intitulada: "DETECÇÃO DO FATOR CORDA: UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS COM E SEM COLORAÇÃO PARA UMA RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DO COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS" apresentada pelo mestrando ROBERTO SILVA para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 29 de junho de 2012.

Profa. Silvana Spíndola de Miranda  
Orientadora

Profa. Wania da Silva Carvalho  
Coorientadora

Prof. Rodolfo de Braga Almeida

Profa. Micheline Rosa Silveira

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **Reitor**

Clélio Campolina Diniz

## **Vice-Reitora**

Rocksane de Carvalho Norton

## **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Ricardo Santiago Gomez

## **Pró-Reitor de Pesquisa**

Renato de Lima Santos

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **Diretor**

Francisco José Penna

### **Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde: Infectologia e Medicina**

#### **Tropical**

### **Coordenador**

Vandack Alencar Nobre Jr.

### **Sub-Coordenador**

Manoel Otávio da Costa Rocha

### **Colegiado**

Manoel Otávio da Costa Rocha

Vandack Alencar Nobre Jr.

Antônio Luiz Pinho

Denise Utsch Gonçalves

Antônio Lúcio Teixeira Jr.

Paula Souza Lage Carvalho

Gláucia Helena Martinho

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio incondicional, sempre sacrificando em prol do meu objetivo, que se concretizou com muita luta e perseverança, em especial à minha amada esposa que com sua paciência me proporcionou tranquilidade e confiança para chegar até o fim deste trabalho.

À minha mãe pelas orações que ela sempre faz pedindo para Deus iluminar o meu caminho e me dar sabedoria.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profª Silvana Spíndola de Miranda, pelo apoio, confiança e incentivo à  
pesquisa.

À Profª Wânia da Silva Carvalho, pelo carinho e atenção.

Ao Prof. José Renan e Prof. Marcos pela sua confiança em ceder o uso de  
equipamento em seu laboratório de pesquisa.

Ao Prof. Geraldo Brasileiro Filho, pelo empréstimo de equipamento, que foi  
fundamental para realização deste estudo.

Ao Dr. Marcos Almeida (Jabuti), por ter sempre contribuído com a sua  
experiência.

Ao bioquímico João Paulo, pela sua contribuição, enquanto funcionário do setor  
de Micobactérias.

Ao Alan e Cláudio da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pelo grande suporte.

À minha amiga Júlia, pelo incentivo para que eu fizesse pós-graduação.

À minha colega de mestrado Dra. Nayane por toda sua paciência e contribuição  
na finalização deste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Micobactérias e Microbiologia.

Aos estagiários do Setor de Micobactéria.

Ao Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina/UFMG.

À FUNED, pelo trabalho de identificação das micobactérias.

Ao Laboratório de Micobactérias da Unidade Funcional - Patologia Medicina  
Laboratorial.

Ao grupo de pesquisa em micobactérias da Faculdade de Medicina,  
principalmente a Lethicia.

À minha esposa pela sua paciência e compreensão, e aos meus filhos pelo  
apoio e carinho que sempre tiveram por mim, estando sempre dispostos a me  
ajudar nos momentos mais difíceis.



*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo”. “Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar.

## RESUMO

A diferenciação rápida entre *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosa é essencial para o tratamento adequado dos pacientes, principalmente coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana ou pacientes com doenças respiratórias de base, tais como: fibrose cística e sequelas pulmonares prévias. A identificação por métodos básicos e moleculares pode ser usada, porém necessita de uma identificação presuntiva primária para saber qual protocolo deverá ser seguido. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes metodologias com e sem coloração na detecção do Fator Corda para uma rápida identificação presuntiva do complexo *mycobacterium tuberculosis*. Esfregaços de escarro após processados e centrifugados foram corados pelo método de Ziehl-Neelsen e avaliados quanto à presença do Fator Corda. Dois esfregaços de colônias isoladas do meio de Lowenstein Jensen foram corados em lâminas pelo método de Ziehl-Neelsen e Auramina "O" e visualizadas em microscópio à luz branca e fluorescente, respectivamente, e um esfregaço foi visualizado diretamente em microscópio em luz invertida sem coloração para a detecção do Fator Corda. Para a identificação das espécies foi utilizada, como padrão ouro, os testes bioquímicos básicos. Dois observadores realizaram todas as metodologias de maneira cega. Em 10/21 esfregaços de escarro (47,6%) foram detectados o Fator Corda, o que correspondeu a 100% de sensibilidade e especificidade. Em 88/101 culturas de micobactérias coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen (87,1%) foram detectadas o Fator Corda, o que correspondeu a uma sensibilidade de 100%; especificidade 81,3%; valor preditivo positivo 96,6%; valor preditivo negativo 100%; acurácia de 97,0% e Kappa = 0,88 (muito boa concordância - IC95%). Pela coloração de Auramina 89/101 (88,1%) foi visualizado o Fator Corda o que correspondeu a uma sensibilidade de 100%; especificidade 75,0%; valor preditivo positivo 95,5%; valor preditivo negativo 100%; acurácia de 96,0% e Kappa = 0,83 (muito boa concordância - IC95%). Sem coloração e visualização direta e microscópio à luz invertida em 90/101 (89,1%) foi visualizado o Fator Corda o que correspondeu uma sensibilidade de 100%; especificidade 68,8%; valor preditivo positivo 95,5%; valor preditivo negativo 100%; acurácia de 95% e Kappa = 0,79 (boa concordância - IC95%) sem coloração com microscópio à luz invertida. A especificidade alcançou 100% quando associada à observação das características das colônias em meio de cultura. Houve alta concordância dos resultados entre os dois observadores. A detecção do Fator Corda para a identificação presuntiva do complexo *mycobacterium tuberculosis* tem excelente acurácia tanto pela coloração direta do escarro, quanto em colônias positivas pelas metodologias de Ziehl-Neelsen, Auramina ou sem coloração, visualizada em microscópio à luz branca, fluorescente e de luz invertida, respectivamente, e pode ser utilizada para direcionar as metodologias de identificação definitiva em laboratórios de micobactérias. A metodologia sem coloração é mais rápida, mas depende de treinamento técnico efetivo. É importante ressaltar que não há trabalhos descritos na literatura que comparem metodologias de detecção do Fator Corda, porém é necessário que outros laboratórios desenvolvam suas próprias experiências, para que se possa realizar novas pesquisas e comparações.

**Descritores:** Tuberculose; Identificação de Micobactérias; Fator Corda.

## ABSTRACT

The quick differentiation between *M. tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria is essential for the adequate treatment of patients, mainly those that are coinfecting with the Human Immunodeficiency Virus or patients with basal respiratory diseases, such as: cystic fibrosis and previous pulmonary sequels. The identification by basic and molecular methods can be used; however, such a use requires primary presumptive identification to know which protocol should be followed. Hence, the purpose of this study was to evaluate different methodologies, with and without coloration, in the Cord Factor detection, to enable a quick presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Sputum smears were colored by the Ziehl-Neelsen method after processing and centrifugation, being then evaluated for presence of Cord Factor. Two smears from colonies isolated from Lowenstein Jensen medium were colored on slides by the Ziehl-Neelsen method and Auramine "O", and viewed in the microscope at white and fluorescent light, respectively; and a smear was viewed directly in the microscope under uncolored inverted light, for the Cord Factor detection. For the species identification, basic biochemical tests were utilized as golden standard. Two observers developed all methodologies in a blinded manner. Out of the 21 sputum smears, 10 (47.6%) were detected as having the Cord Factor, corresponding so to 100% of sensitivity and specificity. Out of the 101 cultures of mycobacteria colored by the Zielh-Neelsen technique, 88 (87.1%) were detected as having the Cord Factor; which corresponds to a sensitivity of 100%; specificity of 81.3%; positive predictive value of 96.6%; negative predictive value of 100%; accuracy of 97.0% and Kappa = 0.88 (very good concordance - CI95%). By the Auramine coloration, 89 (88.1%) out of 101 smears exhibited the Cord Factor, corresponding so to a sensitivity of 100%; specificity of 75.0%; positive predictive value of 95.5%; negative predictive value of 100%; accuracy of 96.0% and Kappa = 0.83 (very good concordance - CI95%). Without coloration, by direct viewing, and using the microscope under inverted light, 90 (89.1%) out of 101 smears have shown the Cord Factor, corresponding so to a sensitivity of 100%; specificity of 68.8%; positive predictive value of 95.5%; negative predictive value of 100%; accuracy of 95% and Kappa = 0.79 (good concordance - CI95%). The specificity achieved 100% when associated to observation of colonies characteristics within the culture medium. There was a high results agreement between both observers. The Cord Factor detection for presumptive identification of *mycobacterium tuberculosis* complex has an excellent accuracy, as in case of direct coloration of sputum, as in case of positive colonies colored by Ziehl-Neelsen and Auramine methodologies, or even without any coloration, if viewed in the microscope at white, fluorescent, or inverted light, respectively; e could be utilized to guide the definitive identification methodologies in mycobacteria laboratories. The uncolored methodology is quicker, but depends on effective technical training. It is important to highlight that there are no works described in the literature, comparing Cord Factor detection methodologies; however, it is necessary that other laboratories develop their own experiences, in order to enable new researches and comparisons.

**Key words:** Tuberculosis; Mycobacteria Identification; Cord Factor.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

AIDS.....	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ATS .....	American Thoracic Society
ATSC.....	Ácido tuberculosteárico
AU .....	Auramina
B.A.A.R .....	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG .....	Bacilo Calmette-Guérin
CDC .....	Centers for Disease Control and Prevention (Centros para Controle e Prevenção de Doenças)
CMTB .....	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CS .....	Cicloserina
FC .....	Fator Corda
FC .....	Fibrose Cística
HIV .....	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC.....	<i>High Performance Chromatography líquida</i>
LAM.....	Lipoarabinomanano
LJ .....	Löwenstein-Jensen
LRP .....	<i>Ensaio Phage luciferase Reporter</i>
<i>M. tuberculosis</i> ....	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MG .....	Minas Gerais
MGIT .....	<i>Mycobacteria Growth Indicator tube</i>
MNT .....	Micobactéria Não Tuberculosa
MS.....	Ministério da Saúde
OADC.....	<i>Oleic acid, Albumin, Dextrose and Catalase</i>
OMS .....	Organização Mundial da Saúde
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
PCTB.....	Programa de Controle da Tuberculose
Pha B MAB.....	<i>Phage Essay amplificado</i>
PNB .....	<i>p</i> -nitrobenzoíco
PRA-hsp65.....	<i>Polimerase Chain Reaction Restriction Analysis of the gene hsp65</i>
PZAse .....	Piramidase

S.....	Estreptomicina
SUS.....	Sistema Único de Saúde
TB.....	Tuberculose
TCH.....	Ácido tiofeno 2- carboxílico
TDM .....	Trehalose-6,6'-dimicolato
TLC .....	Thin-layer chromatography
UFMG.....	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO .....	World Health Organization
ZN .....	Zielh-Neelsen

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detecção do fator corda de 101 cepas isoladas em meio de Loweinstein-Jensen no período de 2009-2011 pelo método de coloração de Ziehl Neelsen .....	35
Tabela 2	Detecção do FC em 101 cepas isoladas em meio de Loweinstein-Jensen no período de 2009-2011 pelo método de coloração pela Auramina "O" .....	35
Tabela 3	Detecção do fator corda de 101 cepas isoladas em meio de Loweinstein-Jensen no período de 2009-2011 sem coloração e visualizados em microscópio de luz invertida.....	36

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Fator corda observado em meio sólido de Lowenstein Jensen. Coloração pelo método de Ziehl-Neelsen aumento de (1000x)..... 23

## FIGURAS ARTIGO

- Figura 1 Observação do fator corda, coloração de Ziehl Neelsen, microscópio óptico (aumento de 1000x) em meio Lowensteins Jensen ..... 37
- Figura 2 Observação do fator corda, coloração de Auramina "O", microscópio à fluorescência (aumento de 400x) em meio de Lowensteins Jensen ..... 37
- Figura 3 Observação do fator corda em microscópio à luz invertida (aumento de 400x) em meio Lowensteins Jensen (LJ)..... 37

## SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	15
1.1	Introdução .....	15
1.1.1	Epidemiologia .....	16
1.1.2	Agente etiológico .....	18
1.1.3	Identificação de micobactérias .....	18
1.1.3.1	Identificação fenotípica .....	19
1.1.3.2	Identificação bioquímica .....	20
1.1.3.3	Identificação molecular .....	20
1.1.3.4	Método imunocromatográfico .....	21
1.1.3.5	Método cromatográfico .....	21
1.1.3.6	Método fagotípico .....	22
1.2	Fator corda .....	23
2	JUSTIFICATIVA .....	26
3	OBJETIVOS .....	27
3.1	Objetivo geral .....	27
3.2	Objetivos específicos .....	27
4	NOTA EXPLICATIVA .....	28
5	ARTIGO .....	29
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	43
7	PERSPECTIVAS .....	44
	REFERÊNCIAS GERAIS .....	45
	ANEXOS	
	Anexo A - Folha de Aprovação do Comitê de Ética .....	47
	Anexo B - Fluxograma esquemático utilizado na metodologia para a observação do fator corda em meio Lowenstein Jensen com e sem coloração .....	48



---

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.1 Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) que faz parte do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) com outras espécies como: *Mycobacterium africanum* (*M. africanum*), *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), *Mycobacterium bovis*-BCG (*M. bovis*-Bacilo Calmette-Guérin), *Mycobacterium microti* (*M. microti*), *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) (ARANAZ *et al.*, 2003) e *Mycobacterium pinnipedii* (*M. pinnipedii*) (COUSINS *et al.*, 2003).

O *M. tuberculosis* infecta principalmente seres humanos e primatas; *M. africanum* é um grupo heterogêneo de isolados encontrados principalmente na África equatorial com propriedades intermediária entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*; O *M. bovis* é predominantemente a causa da tuberculose em bovinos, mas causa a doença em uma ampla variedade de outros animais inclusive o homem; *M. Bovis* - BCG é derivado de uma cepa do *M. bovis* que, após passagem por várias vezes em meio de cultura, pode também causar doença em humanos e apresentar características que o diferenciam da cepa de origem; *M. microti* é um patógeno raro de ratazanas e outros mamíferos de pequeno porte, mas recentemente, foi identificado como a causa de doença em humanos imunocomprometidos (COLE, 2002; LEÃO *et al.*, 2005).

O *M. tuberculosis* tem infectado aproximadamente 1/3 da população mundial, com três milhões de morte por ano (WHO, 2011). Portanto, a diferenciação rápida entre *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas (MNT) é essencial para o tratamento adequado dos pacientes, principalmente coinfectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou pacientes com doenças respiratórias de base, tais como: fibrose cística, doenças pulmonares prévias, entre outras (SIMEÃO *et al.*, 2009).

O tratamento específico imediato e o isolamento dos pacientes dependem da identificação rápida e precisa das micobactérias envolvidas. Isso não raro

representa um grande desafio para os profissionais do laboratório. A identificação do CMTB por meio de métodos tradicionais demanda muito tempo. Tais métodos baseiam-se no crescimento bacteriano em vários substratos e exigem até 15 dias para a identificação definitiva, após o crescimento em cultura (SIMEÃO *et al.*, 2009).

As MNT podem ser encontradas no solo e água (água natural e tratada). As micobactérias, *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*), *Mycobacterium xenopi* (*M. xenopi*) e *Mycobacterium simiae* (*M. simiae*) são recuperadas quase que exclusivamente a partir de fontes de água tratada e, raramente, de outras fontes ambientais. Não há nenhuma evidência de transmissão de animal para humano ou de humano para humano de MNT, mesmo em pacientes com fibrose cística (FC), uma população altamente susceptível (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Atualmente, a identificação por métodos moleculares pode ser usada, porém necessita de uma identificação presuntiva primária para saber qual protocolo molecular será seguido. Alguns autores referem-se a esses métodos como caros para serem utilizados em países onde a identificação rápida seria necessária, principalmente onde concentram a maioria dos casos de coinfectados TB/HIV (WHO, 2011). A avaliação de custo efetividade não tem sido feita para avaliar os verdadeiros gastos em países em desenvolvimento (SIMEÃO *et al.*, 2009).

### 1.1.1 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a estimativa global de doentes por TB em 2009 foi de 9,4 milhões de casos incidentes, 14 milhões de casos prevalentes, 1,3 milhões de mortes, sendo que 0,38 milhões de mortes foram entre pessoas com HIV positivo. Aproximadamente um bilhão de indivíduos estará infectado pelo *M. tuberculosis*, 200 milhões desenvolverão doença ativa e 70 milhões morrerão até 2020 (WHO, 2010).

Em 2009, o Brasil notificou 72.000 casos novos de TB correspondendo a um coeficiente de incidência de 38/100.000 habitantes. Destes, 41.117 casos novos foram bacilíferos (casos com baciloscopia de escarro positiva), apresentando um coeficiente de incidência de 41/100.000 habitantes. Estes indicadores colocam o

---

Brasil na 19ª posição em relação ao número de casos e na 104ª posição em relação ao coeficiente de incidência. A distribuição dos casos está concentrada em 315 dos 5.564 municípios do país, correspondendo a 70% da totalidade dos casos. Em 2008 a TB no Brasil foi a quarta causa de morte por doenças infecciosas e a primeira causa de morte dos pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (WHO, 2010). No Estado de Minas Gerais, foram constatados aproximadamente 6.000 casos de TB nos últimos seis anos com coeficiente de incidência de 23/100 mil habitantes, o que representa o quarto menor coeficiente de incidência da região sudeste, e a quarta maior carga de TB no país. Em sua maioria, os óbitos ocorrem nas regiões metropolitanas e em unidades hospitalares. O coeficiente de mortalidade foi de 1,3/100 mil.

Em 2010, foram notificados cerca de 840 casos de tuberculose, em moradores de Belo Horizonte. Destes, 692 são casos novos (coeficiente de incidência de 28/100 mil). Cerca de 50% dos casos ainda são descobertos em hospitais, serviços de urgência e ambulatórios de referência (BELO HORIZONTE, 2011). A capital atende também casos de tuberculose em moradores de outras cidades, principalmente da sua Região Metropolitana, o que significa um acréscimo de 30% no número total de casos atendidos em Belo Horizonte (BELO HORIZONTE, 2011).

Para que haja redução da incidência de TB é necessário que se descubram, no mínimo, 70% dos casos estimados de tuberculose pulmonar bacilífera (a forma transmissível da doença) e destes, pelo menos 85% sejam curados, com índices de abandono toleráveis de até 5% (WHO, 2010).

Estudos mostram que há uma variabilidade geográfica marcante tanto na prevalência quanto na distribuição das espécies responsáveis pelas doenças causadas por MNT amplamente distribuídas no ambiente com altas taxas de isolamento em todo o mundo (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Observa-se que, nos países desenvolvidos, a incidência de TB diminuiu e a ocorrência de MNT em doenças pulmonares aumentou. A pandemia da AIDS foi o que mais contribuiu para este aumento (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Nos países em desenvolvimento, pouco se sabe sobre a ocorrência das MNT em indivíduos HIV negativos e positivos. No Brasil, verifica-se um aumento da doença por MNT após a epidemia da AIDS, mas os dados sobre a frequência das espécies e a prevalência da doença ainda não são exatamente conhecidos (BONA *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Agente etiológico

O gênero *Mycobacterium* consiste em bastonetes aeróbios imóveis, não esporulados e que ocasionalmente formam filamentos ramificados. Sua classificação é baseada na sua ácido-resistência, presença de ácidos micólicos contendo 60 a 90 carbonos clivados por pirólise para formar ácidos graxos metil ésteres C22 a C26 e alta quantidade de guanina mais citosina (G + C) 61% a 71% constitui o seu DNA. A estrutura básica da parede celular das micobactérias é mais complexa que a de outras bactérias; proteínas, manosídios de fosfatidilinositol e lipoarabinomanano (LAM) se encontram ancorados na membrana plasmática. A camada de peptidoglicanos forma a base sobre a qual se ligam arabinogalactanos, que são polissacarídeos ramificados formados por D-arabinose e D-galactose. O resíduo terminal de D-arabinose é esterificado, formando ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular, com moléculas glicolípídicas e peptidoglicolípídios. Os componentes lipídicos compõem 60% do peso da parede celular. Proteínas e porinas de transporte estão distribuídas pelas camadas da parede celular, constituindo 15% de seu peso. As proteínas são antígenos biologicamente importantes, estimulando a resposta imune celular do paciente contra a infecção. Outros fatores de virulência também estão associados, como o fator corda (FC): glicopeptídeo tóxico para as células mamíferas capaz de inibir a migração de leucócitos polimorfonucleares (MURRAY *et al.*, 2009).

### 1.1.3 Identificação de micobactérias

As culturas para micobactéria que crescem em meio sólido Lowenstein-Jensen (LJ), são analisadas macroscopicamente quanto à cor das colônias; sua morfologia, o tempo de crescimento e microscopicamente quanto à sua capacidade de formar FC (BRASIL, 2008).

Para a identificação do CMTB em LJ, as colônias devem ser acromógenas, de aspecto rugoso, formar corda, ter o crescimento inibido em presença ácido p-nitrobenzóico (PNB) e o teste de niacina ser positivo. Para a definição da espécie *M. tuberculosis* deve haver crescimento em LJ acrescido de ácido tiofeno 2-carboxílico (TCH); inibição em PNB; crescimento em presença de estreptomicina (S); crescimento acrescido de cicloserina (CS); teste da preferência de oxigênio (crescimento na superfície do meio); teste da Piramidase (PZAse) negativo; teste de redução do nitrato positivo; teste combinado da produção de niacina e redução de nitrato positivos (BRASIL, 2008).

O diagnóstico de doença por MNT exige muita cautela, pois o seu isolamento, a partir de espécimes clínicos não estéreis, pode significar colonização transitória ou contaminação. A *American Thoracic Society* recomenda que o diagnóstico dessas doenças seja feito com base em uma série de critérios bacteriológicos, clínicos e radiológicos. Por essa razão, a correlação clínico-laboratorial é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico de doença por MNT e para determinação da estratégia terapêutica (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, o número MNT isoladas de espécimes clínicos vem aumentando, em parte devido a infecções oportunistas que acompanham a imunossupressão. Tradicionalmente, o diagnóstico definitivo de infecções por micobactérias depende do isolamento e identificação dos agentes causadores e requer uma série de testes bioquímicos específicos. Em razão das espécies de micobactérias apresentarem diferentes sensibilidades aos fármacos, a identificação precisa é crucial para a adoção adequada da terapia medicamentosa (SENNA *et al.*, 2011).

### **1.1.3.1 Identificação fenotípica**

A identificação fenotípica das micobactérias inclui um conjunto de testes baseados em características das culturas tais como tempo e temperatura de crescimento. A temperatura pode variar de 25 a 45°C de acordo com a espécie e produção de pigmentos. As características bioquímicas também são de grande

importância na identificação das espécies de MNT, como a capacidade de crescimento em meios seletivos e testes enzimáticos. O tempo de crescimento inferior a sete dias é considerado como um tempo rápido e é um parâmetro importante de identificação para as MNT (BRASIL, 2008).

### 1.1.3.2 Identificação bioquímica

Métodos bioquímicos utilizados para diferenciação das espécies de MNT são: crescimento em meio de cultura LJ com adição de NaCl a 5%, diferencia *M. Tuberculosis* e *Mycobacterium fortuitum* (*M. fortuitum*); hidrólise do tween 80 entre *M. kansasii* e *Mycobacterium avium* (*M. avium*); arilsulfatase 3 e 14 dias entre *M. fortuitum* e *M. avium*;  $\beta$ -galactosidase entre *M. chelonae* e *M. avium*; redução do telurito de potássio entre *M. tuberculosis* e *M. avium*; teste da urease entre *M. bovis* (BCG), *M. kansasii* e *M. avium*; inibição de crescimento em meio com adição de citrato de sódio; inibição de crescimento em meio com adição de manitol e inibição de crescimento em meio com adição de inositol entre *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. peregrinum* e *M. abscessus* (ARANAZ *et al.*, 2003).

### 1.1.3.3 Identificação molecular

Plikaytis *et al.* (1992 citado por TELENTI *et al.*, 1993), utilizando regiões distintas do gene, descreveram a identificação bem sucedida de micobactérias por meio da análise de restrição por digestão de fragmentos amplificados do gene *hsp 65* — *hsp65 PCR-Restriction enzyme analysis (PRA, análise por enzimas de restrição por PCR do gene hsp 65)*. A maioria dos padrões de DNA gerados para a análise dos produtos amplificados por meio da PCR do *Mycobacterium* é específica para cada espécie (TELENTI *et al.*, 1993).

O método consiste na amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de um fragmento de 439 pb do gene *hsp65*, que depois é digerido usando-se duas enzimas de restrição, *BstII* e *HaeIII*. A determinação da espécie é possível comparando os padrões de restrição com um algoritmo. Essa metodologia pode

diferenciar a maioria das espécies de MNT, mas não as do CMTB (TELENTI *et al.*, 1993).

#### **1.1.3.4 Método imunocromatográfico**

A MPT64 é uma proteína secretora de 24 kDa e é um dos principais antígenos da bactéria da TB. Recentemente, a MPT64 foi utilizada para diferenciar as micobactérias pertencentes ao CMTB de outras espécies micobacterianas (TOMIYAMA *et al.*, 1997). A Diagnostics, Inc. (SD) (Yongin, Coréia) desenvolveu o SD BIOLINE TB AgMPT64 teste RAPID®, um ensaio simples e rápido que utiliza anticorpos monoclonais de rato anti-MPT64 capaz de discriminar por imunocromatografia quais micobactérias pertencem ao CMTB das MNT.

Este teste, comparado à identificação em meio de cultura por método convencional, considerado padrão ouro, teve sensibilidade e especificidade de 100%. É um teste extremamente simples e não exige qualquer preparação da amostra ou de instrumentação, pode ser realizado por crescimento em meios de cultivos líquido ou sólido.

#### **1.1.3.5 Método cromatográfico**

##### **Cromatografia em camada delgada**

A *Thin-layer chromatography* (TLC), cromatografia em camada fina tem sido utilizada por vários laboratórios para confirmação rápida de identificação micobacteriana de acordo com o seus perfis de ácidos micólicos. A TLC é uma técnica útil devido à sua simplicidade e requer pequenas quantidades de material. Esta técnica consiste de uma fase estacionária imobilizada em uma placa de vidro ou de plástico e um solvente. A amostra pode ser líquida ou dissolvida em um solvente volátil e, então, depositada como um ponto na fase estacionária. Os constituintes da amostra podem ser identificados com a execução simultânea de padrões e da amostra desconhecida. Uma borda da placa é então colocada num reservatório de solvente e o solvente migra para a placa por capilaridade. Quando a frente do solvente atinge a outra borda da fase estacionária, a placa é removida do

reservatório de solvente. Os diferentes componentes da mistura que migraram até a placa com diferentes taxas e as manchas separadas são visualizadas. Estas manchas são comparadas em uma tabela que mostra os perfis das espécies das micobactérias mais comumente isoladas. A desvantagem está em não se utilizar espécimes clínicos diretos (LEÃO *et al.*, 2005).

### **Cromatografia líquida de alta eficiência**

O método é baseado na detecção de ácidos micólicos por *High Performance Chromatography líquida* (HPLC), em que todas as espécies de micobactérias têm um ácido micólico padrão em particular. O método consiste em várias etapas que resumidamente são: a colheita das células a partir de cultura de LJ, a evaporação do extrato e a derivatização de ácidos graxos com brometo de bromophenacyl, clarificação das amostras por UV-HPLC. O método consiste na análise de ácidos micólicos, em interpretação do padrão de ácido micólico e identificação das espécies (LEÃO *et al.*, 2005).

As vantagens deste método é que ele pode ser completado em poucas horas, não é caro (sendo que o custo de cada identificação é calculado em 3,00 USD), e pode identificar uma grande variedade de espécies, bem como revelar espécies ainda desconhecidas. As desvantagens são o custo inicial do equipamento, a necessidade de um bom crescimento de bactérias para se ter um padrão de ácido micólico e um profissional com grande experiência em laboratório e na proficiência em interpretação dos padrões de ácidos micólicos (LEÃO *et al.*, 2005).

#### **1.1.3.6 Método fagotípico**

Durante a última década uma série de bacteriófagos específicos com afinidade por micobactérias tem aparecido para o diagnóstico rápido da TB. Desde 1947, mais de 250 tipos diferentes de micobacteriófagos têm sido isolados e descritos, e eles constituíram importantes ferramentas para a manipulação genética de micobactérias. No entanto, um grau de utilidade clínica só foi mostrado por duas das abordagens baseadas em fago desenvolvido até o momento, ou seja, o *Ensaio Phage luciferase Reporter* (LRP) e *Phage Essay amplificado* (ou Pha B MAB).

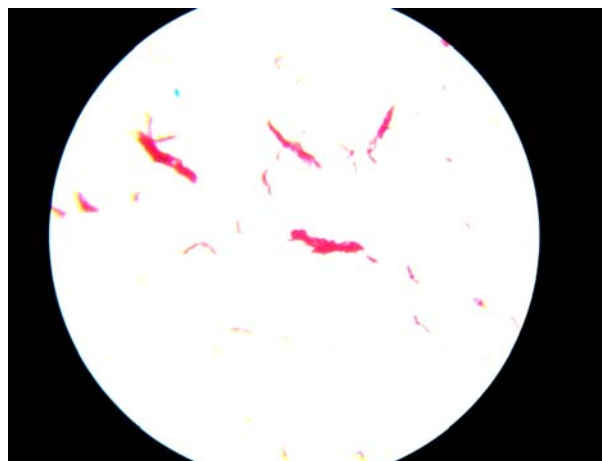


A diferença mais importante entre esses métodos diz respeito à detecção de fagos infectados com células micobacterianas. A LRP depende da luz emitida que é codificada pelo gene de luciferase (*fflux*), que é inserido no fago genoma. Já a Pha B ou MAB é baseado na presença de *M. tuberculosis* viável de células complexas após a amplificação do fago (*Mycobacteriophage D29*) em cultura do *M. smegmatis* e é utilizado principalmente em testes de sensibilidade a isoniazida e rifampicina. O PhaB ou MAB tem sido comercializado (FAST Plaque TB ou a variante PhageTeK MB, Biotec Laboratories Ltda, Ipswich, Suffolk, Reino Unido) para o diagnóstico de TB em amostras respiratórias (ALCAIDE; COLL, 2011).

## 1.2 Fator corda (FC)

A formação de corda ou o chamado FC ou grumos aglomerados lineares pode ser observada em esfregaços de cultura em meio sólido ou líquido, corado pelo método de Ziehl-Neelsen. Geralmente, os bacilos apresentam-se em paliçada adquirindo um aspecto de corda. Outras vezes apresentam-se como grumos compactos assemelhando-se a borrão de corantes (FIG. 1) (BRASIL, 2008). Em vários estudos tem sido avaliada a utilidade de se detectar a formação de corda presente em cepas de *M. tuberculosis*, para a identificação presuntiva do CMTB, uma vez que a maioria das espécies de MNT não apresenta essa característica (ATTORRI *et al.*, 2000).

FIGURA 1: Fator corda observado em meio sólido de Lowenstein Jensen  
Coloração pelo método de Ziehl-Neelsen aumento de (1000x)



Fonte: Acervo do autor (out/2011)

O FC é um efeito causado por uma molécula contendo ácido micólico, a trealose 6,6-dimicolato (TDM), um componente da parede celular das micobactérias envolvido em importantes mecanismos imunomoduladores responsáveis pela virulência das micobactérias. Acredita-se também que o FC desempenhe um papel fundamental na patogênese e na persistência de lesões crônicas e granulomatosas causadas por micobactérias (SILVA *et al.*, 1985). A presença do FC pode ser um determinante no sucesso da infecção por *M. tuberculosis* e na sua sobrevivência nos macrófagos por meio da inibição de eventos de fusão de fagossomos e lisossomos durante a infecção (INDRIGO *et al.*, 2003). A maioria das MNT não forma corda, exceto algumas espécies como *M. kansasii*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*. No entanto, o aspecto microscópico da MNT é de bacilos isolados e de tamanho menor que 2µm (cocobacilo) ou maiores que 5µm. A diferenciação entre a formação da corda das espécies do CMTB e MNT pode também ser feita pela observação do tamanho do bacilo isolado no esfregaço (BRASIL, 2008).

A detecção do FC associada à avaliação morfológica de colônias de micobactérias em meio sólido tem grande utilidade para caracterizar as espécies. As colônias de *M. tuberculosis* têm o formato de migalhas de pão ou de couve-flores, são secas, acromógenas e branco-acinzentadas ou amarelo-acastanhadas. Já as MNT têm um aspecto liso e úmido característico podendo ser alaranjadas ou mesmo amareladas (BRASIL, 2008).

O acometimento pelas MNT em pacientes imunossuprimidos, como os portadores do HIV, é bem descrito na literatura. O aumento de MNT em pacientes não portadores HIV/AIDS é descrito na fibrose cística, doenças pulmonares prévias, sequelas pós-cirurgias, entre outras. Entre as diferentes MNT, o complexo *Mycobacterium chelonae-abscessus* representa um grupo que consiste de três espécies proximamente relacionadas: *Mycobacterium chelonae* (*M.chelonae*), *Mycobacterium abscessus* (*M.abscessus*) e *Mycobacterium immunogenes* (*M.immunogenes*), que frequentemente podem estar associadas à contaminação de reservatórios de água hospitalar, de equipamentos hospitalares e das tubulações do sistema hídrico municipal (GRIFFITH *et al.*, 2007).

---

Segundo um estudo dos Centros para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), *M. abscessus* e *M. chelonae* são espécies proximamente relacionadas e frequentemente associadas a surtos de infecção hospitalar (GRIFFITH *et al.*, 2007).

O que tem contribuído para aumentar a importância das MNT como patógenos humanos foi a melhora na metodologia de identificação nos laboratórios de micobactéria (GRIFFITH *et al.*, 2007). Alguns isolados de MNT, especialmente aqueles de crescimento rápido, podem, entretanto, exibir características morfológicas semelhantes às da *M. tuberculosis*, porém essas são diferenciadas do CMTB que têm crescimento lento (FAIRHUST *et al.*, 2002).

## 2 JUSTIFICATIVA

A observação da formação do FC tem sido considerada um teste rápido na identificação presuntiva do CMTB. A diferenciação entre o CMTB e a MNT é essencial para o tratamento adequado. As MNTs podem acometer pacientes com doenças respiratórias prévias, como fibrose cística, sequelas pulmonares, pós-cirurgias torácicas, além dos coinfectados pelo HIV (SIMEÃO *et al.*, 2009).

Em laboratórios onde não se dispõe de técnicas de identificação mais sofisticadas, a identificação presuntiva do CMTB por meio da observação do FC servirá também para direcionar a realização de diferentes metodologias empregadas na identificação definitiva das micobactérias e teste de sensibilidade (SIMEÃO *et al.*, 2009).

Não há trabalhos descritos na literatura que comparem metodologias de detecção do FC para a identificação presuntiva do CMTB, nas fontes pesquisadas (Medline, Lilacs e Scopus).

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar diferentes metodologias para detectar a presença do Fator Corda (FC) na identificação presuntiva do CMTB.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Utilizar:

- a. coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) para a detecção do FC a partir de esfregaços positivos diretamente de amostra clínica;
- b. coloração pelo método de ZN e Auramina "O" (AU) para a detecção do FC a partir de colônias de micobactérias;
- c. observação direta dos esfregaços de colônias de micobactérias sem coloração utilizando microscopia de luz invertida para detecção do FC.

Comparar as metodologias citadas acima.

#### 4 NOTA EXPLICATIVA

Seguindo a orientação do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde Infectologia e Medicina Tropical a dissertação de mestrado deve conter um artigo a ser submetido em revista indexada.

Artigo a ser submetido para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology* (Qualis B3) intitulado:

**“Detecção do fator corda: utilização de diferentes metodologias com e sem coloração para uma rápida identificação presuntiva do complexo *mycobacterium tuberculosis*”**

5            **ARTIGO**

**DETECÇÃO DO FATOR CORDA: UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES  
METODOLOGIAS COM E SEM COLORAÇÃO PARA UMA RÁPIDA  
INDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DO COMPLEXO *MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS***

Roberto Silva<sup>1</sup>

Wânia da Silva Carvalho<sup>2</sup>

Nayanne Teixeira Dantas<sup>3</sup>

Silvana Spíndola de Miranda<sup>4</sup>

Autor correspondente:

Nome: Roberto Silva

Endereço: Rua Aristides Nonato dos Santos, N° 53, apto. 301

E-mail: roberto@medicina.ufmg.br

---

<sup>1</sup> Setor de Micobactérias/Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>2</sup> Professora Associada I - Faculdade de Farmácia/Departamento de Farmácia Social/Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>3</sup> Mestre pela Universidade Federal de Minas Gerais/Médica

<sup>4</sup> Professora Associada III da Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Minas Gerais/Coordenadora do Grupo de Pesquisa em Micobacterioses CNPq/FM/UFMG/REDE-TB

## RESUMO

A diferenciação rápida entre *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosa é essencial para o tratamento adequado dos pacientes, principalmente coinfectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana ou pacientes com doenças respiratórias de base, tais como: fibrose cística e sequelas pulmonares prévias. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes metodologias com e sem coloração na detecção do Fator Corda (FC) para uma rápida identificação presuntiva do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Um esfregaço de escarro foi corado pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN), dois esfregaços de colônias de micobactérias foram corados pelo método de ZN e Auramina "O" (AU) e um esfregaço foi visualizado diretamente em microscópio à luz invertida (MLI) sem coloração para a detecção do FC. Dois observadores realizaram as metodologias de maneira cega. Em 10/21 esfregaços de escarro (47,6%) foi detectado o FC, o que correspondeu a 100% de sensibilidade e especificidade. Das 88/101 culturas de micobactérias coradas pela técnica de ZN (87,1%) foi detectado o FC, o que correspondeu a uma sensibilidade de 100%; especificidade 81,3%; acurácia de 97,0% e Kappa = 0,88 (muito boa concordância). Pela coloração de AU 89/101 (88,1%) foi visualizado o FC, o que correspondeu a uma sensibilidade de 100%; especificidade 75,0%; acurácia de 96,0% e Kappa = 0,83 (muito boa concordância). Sem coloração e visualização direta em MLI 90/101 (89,1%) foi visualizado o FC, o que correspondeu a uma sensibilidade de 100%; especificidade 68,8%; acurácia de 95% e Kappa = 0,79 (boa concordância) sem coloração com MLI. A especificidade alcançou 100% quando associada à observação das colônias em LJ. Houve alta concordância entre os observadores. A detecção do FC para a identificação presuntiva do CMTB tem excelente acurácia tanto pela coloração direta do escarro, quanto em colônias positivas pelas metodologias de ZN, AU e MLI, sendo esta última mais rápida, e pode ser utilizada para direcionar as metodologias de identificação definitiva em laboratórios de micobactérias.

**Descritores:** Tuberculose; Identificação de Micobactérias; Fator Corda.



## INTRODUÇÃO

As doenças produzidas pelas espécies do gênero *Mycobacterium* são importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo; elas acometem vários indivíduos e principalmente os pacientes imunossuprimidos como os portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). As micobactérias podem pertencer ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) ou as Micobactérias não tuberculosas (MNT)<sup>(8)</sup>.

A maioria dos indivíduos tem doença ativa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). A diferenciação entre o CMTB e a MNT é essencial para o tratamento adequado e conduta de isolamento dos pacientes. O acometimento por MNT em pacientes portadores do HIV é bem descrito na literatura, mas pode acometer pacientes com outras patologias tais como os portadores de fibrose cística, doenças pulmonares crônicas, sequelas, pós-cirurgias, entre outras<sup>(7)</sup>.

Técnicas alternativas para a detecção das espécies micobacterianas têm sido utilizadas, como: cromatografia em camada fina, cromatografia gás-líquida, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e técnicas moleculares baseadas em hibridização, amplificação ou sequenciamento de ácidos nucleicos, mas todas estas técnicas são mais acessíveis em laboratórios de países desenvolvidos que as utilizam principalmente em seus laboratórios de pesquisa<sup>(3)</sup>. Alguns estudos avaliaram a utilidade da observação da formação do Fator Corda (FC) em meio sólido para a identificação presuntiva do CMTB, principalmente em laboratórios que não dispõem de técnicas de identificação mais sofisticada<sup>(2, 5, 10, 11)</sup>. Além disso, a observação do FC pode servir para direcionar a realização de metodologias básicas empregadas na identificação das espécies micobacterianas, ou identificação das MNT por amplificação de ácidos nucleicos e teste de sensibilidade. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar diferentes metodologias com e sem coloração na detecção do FC para uma rápida identificação presuntiva do CMTB. É importante ressaltar que não há trabalhos descritos na literatura que comparem metodologias de avaliação de FC para a identificação presuntiva do CMTB.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Medicina/Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/ETIC 621/08. Foram avaliados consecutivamente no ano de 2009 a 2011 os esfregaços de amostras clínicas e colônias de micobactérias crescidas em meio de Lowensteins Jensen (LJ), para a detecção do FC.

Foram definidos como FC os bacilos que se apresentaram em paliçada adquirindo um aspecto de corda ou em grumos compactos<sup>(4)</sup>.

Para a detecção do FC foram incluídos 21 esfregaços realizados de amostras clínicas (escarro) somente quando as baciloscopias eram de 2+ ou mais, 101 culturas positivas de micobactérias, sendo 85 *M. tuberculosis* e 16 MNT que tiveram a identificação fenotípica realizada no Laboratório de Referência do Estado de Minas Gerais/Fundação Ezequiel Dias (FUNED), sendo considerado padrão-ouro. A morfologia das colônias e o tempo de crescimento micobacteriano em meio de LJ também foram avaliados. Culturas com colônias crescidas na superfície do meio, de cor creme, rugosa foram consideradas como prováveis do CMTB, enquanto colônias lisas, úmidas, cor creme, amareladas ou alaranjadas foram consideradas como MNT<sup>(12)</sup>.

A leitura das lâminas foi realizada por dois observadores sem o conhecimento prévio da identificação das espécies micobacterianas. Cada amostra clínica de paciente foi incluída apenas uma única vez no estudo. As metodologias de coloração e semeio em meio sólido seguiram as Normas Laboratoriais do Ministério da Saúde<sup>(4)</sup>.

Os cálculos estatísticos foram realizados pelo programa *Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos*<sup>(6)</sup>.

## **Metodologia I**

Os esfregaços das amostras clínicas (escarro) foram corados pela metodologia de Ziehl Nelsen (ZN) para observação do FC<sup>(8)</sup>. Não foi realizada a coloração pela Auramina.

## **Metodologia II**

Foram realizados três esfregaços de forma circular em uma lâmina utilizando-se uma gota de água destilada estéril das colônias de micobactérias. Estas colônias foram avaliadas quanto às características morfológicas, coloração e tempo de crescimento. Um esfregaço após seco e fixado foi corado pelo método de ZN e outro pela auramina "O" (AU), os quais foram observados em microscópio de campo claro e de fluorescência, respectivamente (Carl Zeiss Axiolab)<sup>®</sup>. O terceiro foi observado diretamente sem coloração em microscópio de luz invertida (MLI) (Carl Zeiss Jena)<sup>®</sup>.

## **RESULTADOS**

### **Fator corda realizado em esfregaços das amostras clínicas**

Dos 21 esfregaços o FC foi detectado (identificação presumível do CMTB) em 47,6% (10/21), correspondendo a 100% de sensibilidade e especificidade quando comparado ao padrão-ouro. Portanto, muito boa concordância e 100% de acurácia.

### **Fator corda de colônias isoladas em meio de LJ**

Dos 101 esfregaços corados pelo método de ZN foi possível constatar que 88/101 (87,1%) apresentaram o FC e 13/101 (9,9%) não apresentaram o FC, o que correspondeu a uma sensibilidade de 100%; especificidade 81,3%; VPP 96,6%; VPN 100%; acurácia de 97,0% e Kappa = 0,88 (muito boa concordância - IC95%) (tabela 1 e figura 1).

Dos 101 esfregaços corados pelo método de AU foi possível constatar que 89/101 (88,1%) apresentaram o FC e 12/101 (11,9%) não apresentaram o FC, o que correspondeu a uma sensibilidade 100%; especificidade 75,0%; VPP 95,5%; VPN 100%; acurácia de 96,0% e Kappa=0,83 (muito boa concordância- IC95%) (tabela 2 e figura 2).

Dos 101 esfregaços sem coloração e visualizados em MLI foi possível constatar que 90/101 (89,1%) apresentaram o FC e 11/101 (10,8%) não apresentaram o FC, o que correspondeu a uma sensibilidade de 100%; especificidade 68,8%; VPP 95,5%; VPN 100%; acurácia de 95% e Kappa = 0,79 (boa concordância - IC95%) (tabela 3 e figura 3).

Quando a avaliação das características das colônias, coloração e tempo de crescimento foram avaliadas conjuntamente à observação do FC a especificidade alcançou 100% em todas as metodologias (ZN, AU e MLI).

#### **Fator corda realizado em esfregaços das amostras clínicas *versus* fator corda de colônias isoladas em meio de LJ**

Dos 10 esfregaços em que foi visualizado o FC, quando comparados com suas respectivas culturas, essas também tinham a presença do FC (concordância de 100%). Houve alta concordância dos resultados entre os dois observadores.

**TABELA 1** – Detecção do fator corda de 101 cepas isoladas em meio de Loweinstein-Jensen no período de 2009-2011 pelo método de coloração de Ziehl Neelsen

Espécies isoladas	No. cepas LRE	MS (ZN)	
		FC+	FC-
<b>Complexo</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	85	85	0
<i>M. kansasii</i>	2	1	1
<b>Complexo</b> <i>M. avium intracellulare</i>	2	0	2
<i>M. abscessus</i>	3	1	2
<i>M. pregrinum</i>	1	1	0
<i>M. fortuitun</i>	1	0	1
<b>Outras MNT</b>	7	0	7
<b>Total</b>	101	88	13

MS = Meio sólido; FC (+) = Fator corda positivo; FC (-) = Fator corda negativo  
 n° cepas LRE = Número de cepas identificadas no Laboratório de Referência Estadual de Minas Gerais/FUNED

**TABELA 2** – Detecção do FC em 101 cepas isoladas em meio de Loweinstein-Jensen no período de 2009-2011 pelo método de coloração pela Auramina “O”

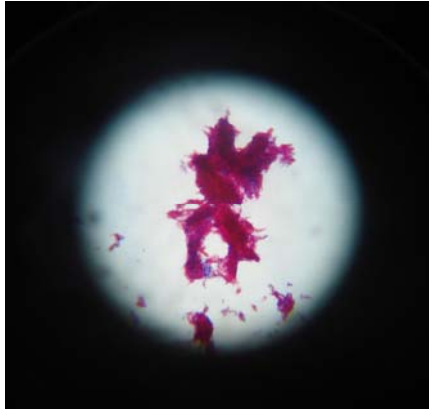
Espécies isoladas	No. cepas FUNED	MS (AU)	
		FC+	FC-
<b>Complexo</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	85	85	0
<i>M. kansasii</i>	2	1	1
<b>Complexo</b> <i>M. avium intracellulare</i>	2	1	1
<i>M. abscessus</i>	3	1	2
<i>M. pregrinum</i>	1	1	0
<i>M. fortuitun</i>	1	0	1
<b>Outras MNT</b>	7	0	7
<b>Total</b>	101	88	12

MS = Meio sólido; FC (+) = Fator corda positivo; FC (-) = Fator corda negativo  
 n° cepas LRE = Número de cepas identificadas no Laboratório de Referência Estadual de Minas Gerais/FUNED

**Tabela 3** – Detecção do fator corda de 101 cepas isoladas em meio de Loweinstein-Jensen no período de 2009-2011 sem coloração e visualizadas em microscópio de luz invertida

Espécies isoladas	No. cepas LRE	MS (LI)	
		FC+	FC-
<b>Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	85	85	0
<i>M. kansasii</i>	2	1	1
<b>Complexo <i>M. avium intracellulare</i></b>	2	0	2
<i>M. abscessus</i>	3	1	2
<i>M. pregrinum</i>	1	1	0
<i>M. fortuitum</i>	1	0	1
<b>Outras MNT</b>	7	2	5
<b>Total</b>	101	90	11

MS = Meio sólido; FC (+) = Fator corda positivo; FC (-) = Fator corda negativo  
 n° cepas LRE = Número de cepas identificadas no Laboratório de Referência Estadual de Minas Gerais/FUNED



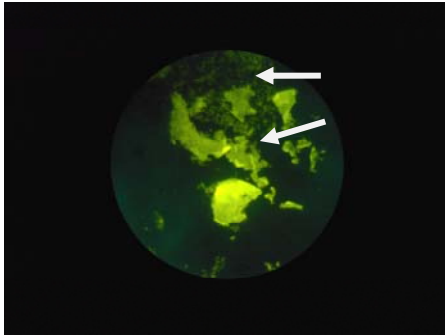
A = presença do fator corda



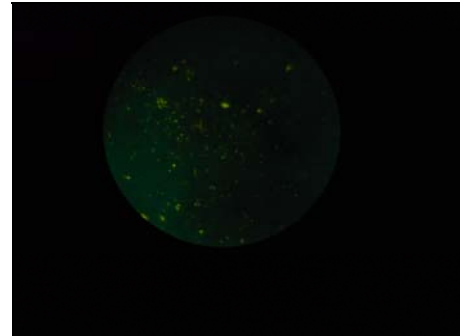
B = ausência do fator corda

**Figura 1:** Observação do fator corda, coloração de Ziehl Neelsen, microscópio óptico (aumento de 1000x) em meio Lowensteins Jensen

Fonte: Acervo do autor (junho 2011)



A = presença do fator corda



B = ausência do fator corda (bacilos difusos) (seta maior artefatos; seta menor grumos de bacilos (fator corda))

**Figura 2:** Observação do fator corda, coloração de Auramina "O", microscópio à fluorescência (aumento de 400x) em meio de Lowensteins Jensen

Fonte: Acervo do autor (junho 2011)



A = presença do fator corda (grumos)



B = ausência do fator corda.

**Figura 3:** Observação do fator corda em microscópio à luz invertida (aumento de 400x) em meio Lowensteins Jensen (LJ)

Fonte: Acervo do autor (junho 2011)

## DISCUSSÃO

A identificação rápida de pacientes portadores de micobactérias do CMTB ou MNT tem grande importância epidemiológica, além da indicação terapêutica mais adequada e na conduta de isolamento, principalmente em hospitais de alta complexidade.

Apesar da detecção de bacilo álcool ácido resistente no escarro possuir baixa sensibilidade, este permanece como um dos exames mais utilizados para o diagnóstico da TB pulmonar<sup>(14)</sup>, e uma identificação presuntiva do CMTB pode auxiliar em tomadas de decisões, em casos de pacientes imunossuprimidos (pacientes portadores do HIV, neoplasias, transplantes, entre outras patologias). Estudos realizados em Hospitais Gerais relatam a presença de MNT em 15% dos isolados de pacientes internados, demonstrando a importância da presunção diagnóstica<sup>(13)</sup>.

No Japão pesquisadores descreveram um resultado pouco expressivo na avaliação de esfregaços de escarro para a identificação presuntiva do CMTB quando as amostras tinham uma positividade de 2+ ou mais, corados pela técnica de ZN<sup>(1)</sup>. No presente estudo foi observada alta sensibilidade, especificidade e acurácia, o que discorda deste estudo. Não foi possível observar o FC no esfregaço das amostras clínicas corado pela AU após um estudo piloto, pois os bacilos sempre se apresentaram de forma isolada, motivo pelo qual esta técnica não foi realizada neste trabalho.

Alguns estudos avaliaram a utilidade da formação do FC em meio líquido ou sólido para a identificação presuntiva do CMTB<sup>(9)</sup>. Nesse estudo foi avaliado em meio sólido a presença do FC pelos métodos de coloração de ZN e AU, e sem coloração em MLI. A sensibilidade (100%, 100%, 100%), o VPP (96,6%, 95,5%, 95,5%) e o VPN (100%, 100%, 100%), respectivamente, foram superiores aos encontrados por outros autores no que se refere ao método de coloração pelo ZN. Esses autores demonstraram uma variação de 63,5 a 85,0%, 90,0 a 99,2% e 69,7 a 98,8%, para sensibilidade, VPP e VPN, respectivamente. A especificidade de 81,3% para o ZN foi menor do que os trabalhos encontrados na literatura. Em relação à AU



75% e MLI 68,8% também apresentaram baixa especificidade, mesmo que dados não tenham sido encontrados para comparação. Porém, a observação morfológica das culturas tais como: aspecto, cor das colônias e o tempo de crescimento, associado à observação do FC, possibilitaram corrigir estas discordâncias. Este fato tem sido descrito por outros autores que também tiveram identificações equivocadas quando utilizaram o FC como teste de identificação presumível do CMTB sem a avaliação prévia das colônias<sup>(15)</sup>.

Não há estudos que relatam a utilização da metodologia de AU e MLI na observação do FC em colônias de micobactérias para a identificação presuntiva do CMTB. Os resultados mostram que houve uma excelente acurácia e concordância na comparação entre as metodologias de ZN, AU e MLI (97%, 96%, 95% e 0,88, 0,83, 0,79, respectivamente).

Na comparação entre os métodos de coloração a vantagem do método de ZN em relação à AU pode ser a formação de borrões que podem confundir a visualização do FC na fluorescência, por outro lado a AU não emite vapores tóxicos por não necessitar de aquecimento. A visualização utilizando a MLI que não utiliza coloração e se observa diretamente ao microscópio foi, portanto, mais rápida.

Apesar da baixa prevalência em nosso meio de MNT e o alto VPN encontrado nesse estudo demonstra a fundamental importância em descartar as MNT para que haja uma condução adequada de procedimentos, como descrito anteriormente. Porém, o número de cepas de MNT foi pequeno e muitas espécies podem não estar representadas neste estudo, sendo necessários então que outros laboratórios desenvolvam as suas próprias experiências, para se possam realizar novas pesquisas e comparações.

Um maior número de esfregaços de amostras clínicas coradas pelo método de ZN deverá ser realizado para melhor avaliação, pois somente 21 amostras foram testadas, mesmo sendo observada uma excelente concordância.

A observação independente dos dois observadores teve alta concordância entre os métodos demonstrando a facilidade dos métodos, porém, são necessários

---

treinamentos técnicos para a realização das metodologias, principalmente para a AU e MLI.

Assim, pode-se concluir que é possível fazer a identificação presuntiva do CMTB utilizando a análise visual diretamente de esfregaço de escarro com 2+ ou mais e dos esfregaços das colônias em meio sólido com ou sem coloração. Estes métodos podem ser utilizados em laboratórios onde se dispõe de microscópio de fluorescência e luz invertida. A presença ou não do FC pode ser útil para guiar decisões, definir condutas em laboratórios que realizem os testes mais complexos como testes bioquímicos e moleculares e na realização de testes de sensibilidade, gerando menor custo e diminuindo o tempo.

**Apoio financeiro:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

## REFERÊNCIAS

1. Abe, K.; Ohtani, S.; Hara, M.; Rinsho, Byori. (2006). Cord formation in smear specimen prepared from sputum for a more rapid method of presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Rinsho Byori*. 54(2):116-20.
2. Attorri, S.; Dunbar, S.; Clarridge, J.E. 3rd. (2000). Assessment of morphology for rapid presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*. *J. Clin. Microbiol.* 38(4):1426-9.
3. Barreto, M.M.; Carlos, V.C.A.; Candelaria, B.R. (2000). Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Pública Méx.* 42(6):484-489.
4. Brasil, Ministério da Saúde. (2008) Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias*. Brasília, DF.
5. Collins, C.H.; Grange, J.M.; Yates, M.D. (1997). *Tuberculosis bacteriology: organization and practice*. 2nd ed. London, Butterworth-Heinemann.. p. 139.
6. Godoy, M.F.; Braile, D.M. (1999). *Cálculos estatísticos básicos para testes diagnósticos*. Available at: <http://www.braille.com.br/DOWNLOAD/TestDiag.xls>. Accessed 27 March 2011
7. Kasi, V.R.; Suresh, B. (2007). Tuberculosis of the urinary tract. In: Floege, J.; Johnson, R.J.; Feehally, J. *Comprehensive clinical nephrology*. 3rd edition. Elsevier.
8. Leão, S.; Martin, A.; Mejia, I.; Palomino, J.C.; Robledo, J.C.; Telles, M.A. (2005) (Editors). *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*. Berlim, Vanden Broele.
9. Lorian, V. (1966). Direct cord reading medium for isolation of mycobacteria. *Appl. Microbiol.* 14:603-607.
10. Monteiro, P.H.T.; Martins, M.C.; Ueki, S.Y.M.; Giampaglia, C.M.S.; Telles, M.A.S. (2003). Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Braz. J. Microbiol.* 34 (2): 171-174.
11. Morris, A.J.; Reller, L.B. (1993). Reliability of cord formation in BACTEC media for presumptive identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 31(9): 2533.
12. Simeão, F.C.S.; Chimara, E.; Oliveira, R.S.; Telles, M.A.S. (2009). Detecção do fator corda e avaliação do aspecto macroscópico das colônias de micobactérias: um eficiente teste de triagem combinado para a identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em meios sólidos. *J. Bras. Pneumol.* 35(12):1212-1216.

- 
13. Spindola de, M.S.; Toledo, A.R.P.; Ribeiro, S.R.; Campos, I.M.; Sthur, P.M.O.D.; Kritski, A.L. (2008). Incidência de TB diagnosticada no pronto-atendimento de um hospital escola na região sudeste do Brasil. *J. Bras. Pneumol.* 35(2):174-178.
  14. World Health Organization. (2009). *Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financy*. Geneva, World Health Organization.
  15. Yagupsk, Y.P.V.; Kaminski, D.A.; Palmer, K.M.; Nolte, F.S. (1990). Cord formation in BACTEC 7H12 medium for rapid, presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 28 (6): 1451-1453.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho propõe a melhoria e agilidade na identificação do *M. tuberculosis* e de MNT em um laboratório de rotina de micobactérias, onde são recebidas amostras clínicas de pacientes provenientes de um hospital e de seus anexos ambulatoriais de média e alta complexidade. Dentre os pacientes que frequentam o HC/UFMG pode-se destacar os transplantados, portadores de HIV, pacientes com diabetes e portadores de outras patologias que predispõem a infecção e/ou doença pelo *M. tuberculosis*, e por outras micobactérias.

O treinamento da metodologia deve ser feito por um profissional experiente, com capacidade para percepção dos detalhes na morfologia dos bacilos, pois, apesar da observação do FC ser uma característica peculiar nas micobactérias do CMTB podem-se observar fatores de confusão.

Foi realizada a observação da presença do FC em amostras clínicas cultivadas em meio líquido, porém houve grande contaminação, impossibilitando a análise dos resultados, sendo então necessária a melhor padronização desta metodologia.

---

## **7            PERSPECTIVAS**

Utilização em rotina da observação do FC, diretamente dos esfregaços de amostras clínicas e das colônias com e sem coloração.

Treinamento da equipe do laboratório de micobactérias.

Utilização de meio líquido para a observação do FC na identificação presuntiva do CMTB.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ALCAIDE, F.; COLL, P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v.9 (Supl 1), p.34-40, 2011.

ARANAZ, A. et al. Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.5 (Pt 6), p.1785-1789, Nov. 2003.

ATTORRI, S.; DUNBAR, S.; CLARRIDGE 3rd., J. E. Assessment of morphology for rapid presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium kansasii. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, n.4, p.1426-1429, 2000.

BELO HORIZONTE. Secretaria Municipal de Saúde. Gerência de Vigilância em Saúde e Informação. *Boletim da Vigilância em Saúde*, v.1, n.6, junho 2011.

BONA, M. G. M. et al. Análise de restrição enzimática do gene hsp65 de isolados clínicos de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar em Teresina, Piauí. *J. Bras. Pneumol.*, v.37, n.5, p.628-635, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias*. Brasília, DF 2008.

BRASIL. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. *Epidemiologia da tuberculose em Minas*. Coordenação Estadual de Pneumologia Sanitária - SE/SES-MG/SUS. 2010.

COLE, S. T. Comparative and functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Microbiology*, v.148, (Pt 10), p.2919-2928, Oct. 2002.

COUSINS, D. V. et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.53, p.1305-1314, 2003.

FAIRHUST, R. M. et al. Mycobacterium abscessus empyema in a lung transplant recipient. *J. Heart Lung Transplant.*, v.21, n.3, p.391-394, 2002.

GRIFFITH, D. E. et al. An Official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.175, p 367-416, 2007.

INDRIGO, J.; HUNTER, R. L. J. R.; ACTOR, J. K. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of urine macrophages. *Microbiology*, v.149 (Pt 8), p.2049-2059, 2003.

LEÃO, S. et al. (Editors). *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*. Berlim: Vanden Broele, 2005.

---

MURRAY, P. R. et al. *Microbiologia médica*, 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 29, p.289-302.

PLIKAYTIS, B. B. et al. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, n.7, p.1815–1822, July 1992.

SENNA, S. G. et al. Identificação de micobactérias não tuberculosis isoladas de sítios estéreis em pacientes em um hospital universitário na cidade do Rio de Janeiro. *J. Bras. Pneumol.*, v.37, n.4, p.521-526, 2011.

SILVA, C. L.; SERPUÍ, M. E.; FAZIOLI, R. A. Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria. *Am. J. Pathol.*, v.118, n.2, p.238-2324, 1985.

SIMEÃO, F. C. S. et al. Detecção do fator corda e avaliação do aspecto macroscópico das colônias de micobactérias: um eficiente teste de triagem combinado para a identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em meios sólidos. *J. Bras. Pneumol.*, v.35, n.12, p.1212-1216, 2009

TELENTI, A. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.2, p.175-178, 1993.

TOMIYAMA, T.; MATSUO, K.; ABE, C. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* by an immunochromatography using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.1, p.5, 1997.

WHO. World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010 *Global Report on Surveillance and Response* (document WHO/HTM/TB/2010.3).

WHO. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control 2011*. Genebra, 2011. 258p.



**ANEXO A**  
**FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 621/08

Interessado(a): Profa. Silvana Spíndola de Miranda  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina - UFMG

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de fevereiro de 2009, o projeto de pesquisa intitulado "**Teste de identificação presuntiva do Mycobacterim tuberculosis através da detecção do fator corda**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

**ANEXO B**  
**FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO UTILIZADO NA METODOLOGIA PARA A**  
**OBSERVAÇÃO DO FATOR CORDA EM MEIO LOWENSTEIN JENSEN COM E**  
**SEM COLORAÇÃO**

