CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADORES DA DETECÇÃO DO FATOR CORDA PARA A IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Paulo Henrique Marques Franco[1], Priscilla Yukari Ueno[1], Daniela Adélia Fernandes[1], Amanda Aparecida Silva de Aguiar[1], Regina Rafael Teixeira[1], André dos Santos de Barros Lordelo[2], Leonilda Chiari Galle[1], Eliana Peresi Lordelo[1]

[1]Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Curso de Biomedicina, Presidente Prudente, SP. [2]Universidade do Sagrado Coração - USC, Bauru, SP. E-mail: elianaperesi@unoeste.br

RESUMO

A detecção do fator corda pode favorecer o diagnóstico definitivo e início do tratamento antituberculose. O objetivo deste estudo foi avaliar a concordância interobservadores da leitura de esfregaços micobacterianos corados pela técnica de Ziehl-Neelsen para a identificação presuntiva do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Três observadores, estudantes da área da saúde, realizaram a leitura às cegas de 30 lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen e seus resultados foram comparados com os de um observador experiente. Para avaliar a concordância entre as leituras foi realizado o Coeficiente Kappa com intervalo de confiança de 95%. Não foi observada nenhuma concordância excelente (κ>0,75) interobservadores. A interpretação e utilização do fator corda para o diagnóstico presuntivo do *M. tuberculosis* é uma técnica que necessita de treinamento para interpretação das variáveis presentes nos esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen e conhecimento teórico do observador para que o resultado possa ser proferido de forma correta.

Palavras chaves: tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, fator corda, diagnóstico, concordância.

INTEROBSERVER CONCORDANCE FOR THE DETECTION OF THE CORD FACTOR FOR THE PRESUMPTIVE IDENTIFICATION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

ABSTRACT

Detection of cord factor may favor the definitive diagnosis and initiation of antituberculosis treatment. The aim of this study was to evaluate the interobserver concordance of mycobacterial smears stained with Ziehl-Neelsen technique for the presumptive identification of the *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Three observers, healthcare students, conducted a blind reading of 30 slides stained with Ziehl-Neelsen and their results were compared to the results of an experient reader. Kappa coefficient with 95% interval was used to evaluate the concordance between the readings. No excellent interobserver concordance (κ>0.75) was found. The interpretation and use of the cord factor for the presumptive identification of the *M. tuberculosis* is a technique that requires training for the interpretation of the variables of the smear stained with Ziehl-Neelsen technique and theoretical knowledge of the observer to deliver a correct result.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, cord factor, diagnosis, concordance.

INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* é composto por mais de 140 espécies, separado em três grandes grupos: complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), *Mycobacterium leprae* e outras micobactérias não enquadradas nos dois grupos anteriores, conhecidas como micobactérias não tuberculosas (MNT)[1]. O MTBC inclui o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), principal agente etiológico da TB, sendo responsável pela infecção de um terço da população mundial e, no Brasil, foram notificados 69.569 novos casos de tuberculose, e em 2016, 4.426 óbitos por tuberculose, mas calcula-se que este número possa ser maior, em virtude da subnotificação[2].

O diagnóstico presuntivo da TB pulmonar se faz pelos dados clínicos e radiológicos e a confirmação do diagnóstico é obtida pela

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

baciloscopia e/ou cultura. A baciloscopia, pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), é o método para diagnóstico da doença mais utilizado no Brasil, por tratar-se de um procedimento rápido e barato, no entanto, apresenta baixa sensibilidade, detectando 60 a 80% dos casos de TB pulmonar. A cultura para micobactérias é considerada o método padrão ouro para o diagnóstico da TB e quando realizada a partir do escarro, em geral, pode aumentar em 30% o diagnóstico de casos de TB pulmonar não confirmados pela baciloscopia, entretanto tem como principal desvantagem a demora na definição do diagnóstico, pois a reprodução do bacilo é lenta. Como a tuberculose é letal sem tratamento, uma rápida diferenciação entre o MTB e as MNT seria essencial para a condução de um tratamento adequado[3].

Alguns estudos têm avaliado a utilidade de se detectar a formação de corda, conhecido como fator corda, em meio sólido ou líquido, para a identificação presuntiva da TB, já que a maioria das espécies de MNT não apresenta essa característica, acelerando a identificação do MTB e os testes de susceptibilidade à drogas[4-6]. O fator corda pode ser detectado em cultivo de MTB através da formação de uma corda com feixes apertados, constituída de bacilos alinhados paralelamente, lado a lado, ao longo do eixo central da corda. A formação de corda é um efeito causado pela principal molécula contendo ácido micólico, a trealose 6,6-dimicolato (TDM), um componente da parede celular das micobactérias envolvido em importantes mecanismos imunomodula-dores responsáveis pela virulência das micobactérias[6].

A detecção do fator corda associado às características macroscópicas das colônias bacterianas crescidas a partir de amostras biológicas de indivíduos com suspeita de TB pode acelerar a identificação presuntiva do MTB e assim favorecer o diagnóstico definitivo e início do tratamento adequado, principalmente em laboratórios que não utilizam técnicas de identificação mais avançadas, como o teste imunocromatográfico. Desta forma, a leitura comparativa de lâminas para identificação do fator corda entre diferentes alunos nos permitirá avaliar melhor as dificuldades que estes encontraram durante a pesquisa e poderá nos direcionar para treinar outros alunos futuramente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a concordância interobservadores da leitura de esfregaços micobacterianos corados pela técnica de Ziehl-Neelsen para a identificação presuntiva do MTB.

METODOLOGIA

Foram utilizados esfregaços micobacterianos corados pela técnica de Ziehl-Neelsen e avaliados os seguintes parâmetros para a interpretação da leitura: BAAR (Bacilo ácido álcool resistente) presente ou ausente; Fator corda presente ou ausente; MTBC presente ou ausente; MNT presente ou ausente; Contaminação presente ou ausente.

Três observadores (B, C e D), estudantes da área da saúde, realizaram a leitura na objetiva de imersão em microscópio óptico (Nikon Eclipse E100) às cegas de 30 lâminas e seus resultados foram comparados com os de um observador experiente (A) na interpretação dos parâmetros acima citados. Visto se tratar de um teste de confiabilidade, em que a interpretação dos observadores sobre a leitura das lâminas é parte fundamental dos resultados, os esclarecimentos foram breves e sucintos. Os alunos foram esclarecidos a não consultarem os demais colegas durante este processo, assim como, para não comunicarem os demais os resultados obtidos em suas avaliações a fim de se evitar influências nas respostas.

Para avaliar a concordância entre as leituras foi realizado o Coeficiente Kappa (κ), empregando-se o programa Bioestat versão 5.3, e a concordância foi interpretada conforme o valor de Kappa com intervalo de confiança de 95%: $0 \leq \kappa < 0,4$: Fraca (F); $0,4 \leq \kappa \leq 0,75$: Boa (B); $\kappa > 0,75$: Excelente (E).

RESULTADOS

Na Tabela 1 demonstramos a frequência absoluta dos parâmetros de leitura dos esfregaços micobacterianos corados pela técnica de Ziehl-Neelsen entre o observador A (valor de referência) e os observadores B, C e D.

Na Tabela 2 estão demonstrados os resultados obtidos para a concordância interobservadores por meio do valor de Kappa com intervalo de confiança de 95%.

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Tabela 1. Frequências absolutas da interpretação da leitura dos esfregaços micobacterianos corados pela técnica de Ziehl-Neelsen entre o observador A (valor de referência) e os observadores B, C e D.

		Obs B		Obs C		Obs D		
	Obs A	**Presente**	**Ausente**	**Presente**	**Ausente**	**Presente**	**Ausente**	**Total**
BAAR	**Presente**	24	4	18	10	22	6	**28**
	Ausente	1	1	0	2	1	1	**2**
Fator corda	**Presente**	12	10	17	5	11	11	**22**
	Ausente	0	8	1	7	1	7	**8**
MTBC	**Presente**	13	9	17	5	12	10	**22**
	Ausente	1	7	1	7	1	7	**8**
MNT	**Presente**	5	1	5	1	4	2	**6**
	Ausente	10	14	7	17	10	14	**24**
Contami-nação	**Presente**	1	4	1	4	3	2	**5**
	Ausente	6	19	11	14	12	13	**25**

BAAR (Bacilo ácido-álcool resistente); MTBC (complexo *Mycobacterium tuberculosis*); MNT (Micobactérias não tuberculosas); Obs (Observador)

Tabela 2. Estatística Kappa com IC de 95% obtidos entre o observador A (valor de referência) e os observadores B, C e D.

Obs1	**Obs2**		**BAAR**	**Fator Corda**	**MTBC**	**MNT**	**Contaminação**
A	**B**	**Kappa**	0,2105 **F**	0,3902 **F**	0,3534 **F**	0,2667 **F**	-0,0345 **F**
		IC 95%	0,70-0.93	0,53-0,77	0,47-0,80	0,43-0,77	0,53-0,80
	C	**Kappa**	-0,1250 **F**	0,5588 **B**	0,5588 **B**	0,3939 **F**	-0,1538 **F**
		IC 95%	0,40-0,73	0,63-0,90	0,63-0,90	0,63-0,87	0,33-0,63
	D	**Kappa**	0,1322 **F**	0,2683 **F**	0,2292 **F**	0,1667 **F**	0,0098 **F**
		IC 95%	0,57-0,87	0,43-0,70	0,37-0,73	0,43-0,73	0,40-0,67

Valores de Kappa: $0 \leq \kappa < 0,4$: Fraca (F); $0,4 \leq \kappa \leq 0,75$: Boa (B); $\kappa > 0,75$: Excelente (E); MTBC (complexo *Mycobacterium tuberculosis*); MNT (Micobactérias não tuberculosas); Obs (Observador).

De acordo com a análise estatística não foi observada nenhuma concordância excelente ($\kappa>0,75$) interobservadores. Foram obtidos três resultados em que a concordância foi fraca para a pesquisa de BAAR, foram obtidos dois resultados em que a concordância foi fraca e um em que a concordância foi boa para a pesquisa do fator corda, foram obtidos dois resultados em que a concordância foi fraca e um em que a concordância foi boa para a pesquisa do MTBC, foram obtidos três resultados em que a concordância foi fraca para a pesquisa de MNT e foram obtidos três resultados em que a concordância foi fraca para a avaliação da presença de contaminação dos esfregaços.

DISCUSSÃO

Não foram encontrados estudos que avaliaram a presença do fator corda entre diferentes observadores inexperientes para a leitura de lâminas micobacterianas, tornando o nosso estudo único nessa relação. A avaliação da presença de corda em esfregaços micobacterianos parece ser algo fácil e simples de ser realizado, mas se não for executado por um leitor experiente, pode apresentar dificuldades na sua interpretação, como foi visto em nossos resultados.

As espécies do gênero *Mycobacterium* são bastonetes finos, retos, ligeiramente encurvados ou em forma de clava, mas podem ocorrer na forma de cocobacilos curtos, filamentosos ou micelióides. Este gênero apresenta um tamanho médio de 1 a 10 µm de comprimento e 0,2 a 0,6 µm de espessura, tendo o *M. tuberculosis* cerca de 1 a 4 µm de comprimento e 0,5 µm de espessura, enquanto as MNT apresentam bacilos de tamanho menor que 2 µm (cocobacilo) ou maiores que 5µm de comprimento[7-9].

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Nas lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, a identificação de BAAR consiste na pesquisa de bacilos corados em vermelho com o fundo azul[10]. Essa técnica de coloração é utilizada para a realização da baciloscopia. Observa-se uma variação de resultados na visualização e quantificação de BAAR quando a baciloscopia é realizada por diferentes profissionais, variando de uma pessoa para a outra, assim como quando avaliada mais de uma vez pelo mesmo indivíduo[11].

Nossos resultados demonstraram que todos os observadores apresentaram uma concordância (κ) fraca na identificação de BAAR, apesar de um dos leitores ter acertado 25 lâminas em 30 e dos observadores relatarem que não apresentaram dificuldades na interpretação do BAAR. Ao avaliarmos a baixa concordância, devemos considerar a possibilidade da pequena amostragem e do fato de terem somente duas lâminas que eram BAAR ausente terem interferido nesse cálculo. Além disso, nenhum dos observadores havia realizado proficiência em baciloscopia da tuberculose, fator que teria auxiliado na dificuldade para a identificação da presença de BAAR. Estudo sugere um mínimo de 75 lâminas, abrangendo em torno de 48% de lâminas negativas, 5% de inconclusivas e 47% de positivas para a caracterização de proficiência em baciloscopia da tuberculose[11].

A rápida diferenciação do MTBC das MNT colabora para direcionar a identificação da espécie e iniciar o tratamento adequado. O fator corda ajuda na identificação presuntiva do MTBC, já que a maioria das MNT não forma corda, com exceção de algumas espécies, como *M. kansasii*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*. Entretanto, a corda formada pelas MNT apresenta bacilos isolados. Além disso, e a diferenciação entre a formação da corda das espécies do CMTB e MNT pode ser feita pela observação do tamanho do bacilo isolado no esfregaço[9]. Outro autor sugere que é possível a observação do fator corda em MNT, mas que estas produzem “pseudocordas”, isto é, crescimento em cordas incompleto, onde a interpretação dependerá da experiência técnica[12].

Com relação à avaliação do fator corda, um dos observadores apresentou uma boa concordância enquanto os demais apresentaram uma concordância (κ) fraca. Os observadores relataram dificuldade na avaliação da presença do fator corda, pois muitas lâminas eram parecidas. Além disso, havia lâminas provenientes de diferentes meios de cultura, líquido e sólido. Estudo que avaliou a presença de corda em ambos os meios demonstrou que o fator corda visualizado difere nos meios, sendo mais evidente no meio líquido[12].

Quanto à classificação das lâminas em MTBC e MNT, somente um observador obteve uma concordância (κ) boa, enquanto os demais apresentaram uma concordância (κ) fraca. Analisando os resultados apresentados na Tabela 2, podemos perceber que não ficou claro para dois observadores que a classificação do MTBC estava ligada à presença do fator corda, pois os resultados de ambos não foram concordantes. Isso reflete a falta de conhecimento por parte dos participantes do trabalho em relação à interpretação do resultado do fator corda.

A presença de contaminação das lâminas também apresentou uma concordância fraca por todos os observadores. Nesta avaliação, também devemos considerar a possibilidade da pequena amostragem e do fato de terem somente cinco lâminas que apresentavam contaminação terem interferido nesse cálculo. Além disso, a verificação da presença de outros microrganismos, como bactérias e fungos, requer atenção e conhecimento prévio, sendo influenciado diretamente pelo perfil de cada observador. Um observador relatou que o curto espaço de tempo, determinado pelo próprio observador, para a leitura das lâminas possa ter influenciado nos seus resultados. Estudo que avaliou a presença do fator corda em amostras clínicas demonstrou que quando estas foram cultivadas em meio líquido, apresentaram elevada contaminação, fato que impossibilitou a análise dos seus resultados[13].

A detecção do fator corda associada à avaliação morfológica de colônias de micobactérias em meio sólido tem grande utilidade para caracterizar as espécies. As colônias de MTB têm o formato de migalhas de pão ou de couves-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. Entretanto, como o tempo de cultura pode variar de 14 a 28 dias até 8 semanas, laboratórios que recebem um grande volume de amostras clínicas, como hospitais e Laboratórios de Referência, já implantaram sistemas que aceleram o diagnóstico, como a

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

incubação em meio líquido monitorada por sistema informatizado que acusa quando há crescimento celular e, portanto, o tempo de detecção da positividade é menor que o exigido pela cultura sólida. O MTB cultivado em meio líquido normalmente exibe o fator corda, podendo ser identificado após coloração com ácido-álcool, tem-se sugerido um diagnóstico presuntivo e rápido do MTBC pela presença da formação de corda nas culturas de escarro positivas no sistema de cultura líquida (BACTEC)[9,13,14].

Atualmente existe o teste rápido para a detecção do MTBC, o Xpert® MTB/RIF (qPCR) que libera o resultado dentro de duas horas e avalia a resistência da cepa à rifampicina, principal droga utilizada no tratamento antituberculose[15]. No Brasil, a baciloscopia continuará a ser utilizada, principalmente para o controle de tratamento. Além disso, a cultura, segui de testes de sensibilidade antimicrobiana são recomendados quando o Xpert® MTB/RIF for positivo ou somente a baciloscopia for realizada[16].

Outro fator que pode ter interferido nos nossos resultados foi o tempo entre a explicação da visualização e interpretação das variáveis a serem analisadas e o início da leitura das lâminas. Segundo os observadores, isso interferiu na segurança deles em proferir o resultado, mas segundo o observador que proferiu o treinamento, este tempo não deveria interferir na avaliação das lâminas.

CONCLUSÃO

A interpretação e utilização do fator corda para o diagnóstico presuntivo do *M. tuberculosis* é uma técnica que necessita de treinamento para interpretar as variáveis presentes nos esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen e conhecimento teórico do observador para que o resultado possa ser proferido de forma correta. Apesar da avaliação do fator corda ser uma técnica que tende a ser substituída por técnicas moleculares e imunocromatográficas, ainda é um recurso muito útil, por ser de baixo custo e simples execução, colaborando para direcionar as próximas etapas de identificação micobacteriana.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver qualquer potencial conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

REFERÊNCIAS

1. Van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. Semin Respir Crit Care Med. 2013;34(1):103-9. DOI: https://doi.org/10.1055/s-0033-1333569

2. WHO. World Health Organization Publications: Global tuberculosis report 2017.

3. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde, 2011.

4. Attori S, Dunbar S, Clarridge JE. Assessment of morphology for rapid presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium kansasii. J Clin Microbiol. 2000;38(4):1426-9.

5. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. 2018;49:1-18.

6. Monteiro PHT, Martins MC, Ueki SYM, Giampaglia CMS, Telles MADS. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of mycobacterium tuberculosis complex. Braz J Microbiol**.** 2003;34:171-4. DOI: https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000200016

7. Doherty TM, Arditi M. Tb or not TB: that is the question: does TLR signaling hold the answer? J Clin Invest**.** 2004;114(12):1699-703. DOI: https://doi.org/10.1172/JCI23867

8. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. Mediter J Hematol Infect Dis. 2013;5(1):e2013070.

9. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA. The resumption of consumption. A review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(7):697-714. DOI: https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000700001

10. Brasil. Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1.ed. Brasília-DF, 2008.

11. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

bacteriologia da tuberculose. 3.ed. Rio de Janeiro-RJ, 2005.

12. Vieira FD, Salem JI, Ruffino-Netto A, Camargo SA, Silva RRF, Moura LCC et al. Metodologia para caracterização de proficiência em leitura de resultados baciloscópicos para o diagnóstico da tuberculose. J Bras Pneumol. 2008;34(5):304-11. DOI: https://doi.org/10.1590/S1806-37132008000500010

13. Coelho AGV, Zamarioli LA, Reis CMPV, Duca BFL. Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo Mycobacterium tuberculosis**.** J Bras Pneumol. 2007;33(6):707-11. DOI: https://doi.org/10.1590/S1806-37132007000600015

14. Silva R. Detecção do Fator Corda: Utilização de Diferentes Metodologias com e sem Coloração para uma Rápida Identificação Presuntiva do Complexo *Mycobacterium Tuberculosis.* [Dissertação]. Pós-Graduação em Ciência da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG, 2012.

15. Shen GH, Chen CH, Hung CH, Wu KM, Lin CF, Sun YW, et. Al. Combining the Capilia TB assay with smear morphology for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Int J Tubercul Lung Dis. 2009;13(3):371-6.

16. WHO. World Health Organization: Tuberculosis Diagnosis – Xpert MTB/RIF test, 2013.

Recebido para publicação em 17/08/2018
Revisado em 03/09/2018
Aceito em 06/09/2018

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).