DELURCE TADEU DE ARAUJO SPADA

**Detecção de bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em
saliva/muco ou escarro em Centro de Referencia Ambulatorial
para Tuberculose na Cidade de São Paulo: Baciloscopia,
cultura convencional e automatizada**

**Tese apresentada ao Departamento de
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Microbiologia.**

SÃO PAULO

2009

DELURCE TADEU DE ARAUJO SPADA

**Detecção de bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em
saliva/muco ou escarro em Centro de Referencia Ambulatorial
para Tuberculose na Cidade de São Paulo: Baciloscopia,
cultura convencional e automatizada**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Microbiologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Microbiologia.**

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

SÃO PAULO

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Spada, Delurce Tadeu de Araujo.

Detecção de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em saliva/muco ou escarro em Centro de Referência Ambulatorial para Tuberculose na cidade de São Paulo: baciloscopia, cultura convencional e automatizada / Delurce Tadeu de Araujo Spada. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Jorge Timenetsky.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Tuberculose.

Versão do título para o inglês: Detection of bacteria from *Mycobacterium tuberculosis* complex in saliva/mucus or sputum in Ambulatory Reference Center for tuberculosis in the city of São Paulo: bacilloscopy, conventional culture and automated.

Descritores: 1. Baciloscopia 2. Tuberculose pulmonar 3. Escarro 4. Saliva 5. Complexo *Mycobacterium tuberculosis* I. Timenetsky, Jorge II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0191/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Delurce Tadeu de Araujo Spada.

Título da Tese: Detecção de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em saliva/muco ou escarro em Centro de Referencia Ambulatorial para Tuberculose na cidade de São Paulo: baciloscopia, cultura convencional e automatizada.

Orientador(a): Jorge Timenetsky.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Este estudo faz parte do Convênio de Cooperação Científica firmado entre Instituto Clemente Ferreira, Secretária do Estado da Saúde de São Paulo, e o Laboratório de micobacterias, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo.

Á Deus, sem a sua Força, Presença e Cuidado, nada seria e não teria conseguido realizar este trabalho.

Á minha mãe, Elza, que tanto me apóia e apoiou durante toda a minha vida, se sacrificando muitas vezes para que eu estudasse e chegasse aonde cheguei, minha gratidão e reconhecimento.

Ao meu marido, Ivo, companheiro dado por Deus na minha jornada pela terra, e que tem me incentivado, apoiado, Te amo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Ivo, pela paciência comigo e por momentos roubados de sua companhia muitas vezes de final de semana. Obrigada por seu amor demonstrado.

A minha mãe que quantas vezes orou e se angustiou por mim. A senhora é uma mãe maravilhosa, e tem sempre me ajudado.

A família que ganhei quando do meu casamento, meu sogro Sr. Ivo, minha sogra Lea, que tem sido meus incentivadores.

Aos meus cunhados Luciana, Adalberto, pelas palavras de incentivo e carinho

Rubens, Márcia, Giulia, por todas as horas que me alegrei com a Giulia, pelo carinho demonstrado, quando me sentia desanimada.

Eliana, Joana, Mariana e Yohanan, por toda ajuda, carinho e incentivo.

A minha irmã Ramira meu cunhado Ricardo por todo o incentivo e carinho demonstrado.

A Stephanie, e a Renata, minhas sobrinhas queridas, que torceram, e se alegraram comigo por mais esta conquista.

As minhas tias Anita e Antonia, que muito me ajudaram neste percurso, não só me incentivando mas muitas vezes me ajudando de diversas formas.

Aos amigos e irmãos Silvio e Andréia, pelas orações e incentivo.

Aos amigos e irmãos Renato e Celi, por todo apoio e orações.

Aos amigos e irmãos Ricardo e Sirlei pelo encorajamento e orações.

A Leda, que muitas vezes foi mãe para mim, e me ajudou encorajando e orando por mim, da mesma maneira a minha irmã Andréia, e ao Eduardo por todas as palavras de apóio.

Ao Prof. Dr. Jorge Timenetsky pela orientação, ajuda, paciência, por tudo, foi muito bom ser sua aluna.

Ao Dr. Fernando Fiuza de Melo, por todo apoio técnico, orientações, conselhos, ensinamentos e amizade. Sou muito grata e reconheço que sem a sua ajuda este trabalho não teria sido realizado.

Ao Dr. Jorge de Barros Afiune, pela amizade, orientação, apoio, paciência, incentivo e ensinamentos. Sou muito grata.

A Dr^a Denise Rodrigues, pela ajuda e orientação, pela amizade demonstrada, muitas vezes com paciência.

A Elisabete Aparecida de Almeida, Chefe do laboratório do Instituto Clemente Ferreira que me ajudou, incentivou e demonstrou sua amizade.

Aos colegas do Laboratório do Instituto Clemente Ferreira que souberam compreender a importância deste trabalho, me apoiaram e ajudaram a concretizá-lo.

Adalberto Geromino da Silva e a Beatriz Feder pela ajuda nas fotos tiradas para o trabalho.

Aos amigos que ganhei ao trabalhar no Laboratório do Instituto Clemente Ferreira: Beatriz, Claudia, Cleri, Cleusa, Edgar, Elias, Elso, Idemar, Jaciene, José, Lucilene, Lucas, Marcos, Maria Tavares, Marlene, Miriam, Raquel, Sonia.

Aos funcionários do Instituto Clemente Ferreira que me incentivaram com palavras de encorajamento.

A Dr^a Maria Tereza pela amizade e informações epidemiológicas que muito ajudaram no trabalho.

A Maria José da Biblioteca da USP, pelo profissionalismo, competência, e paciência comigo demonstrada.

Ao Dr. Adauto Castelo pelos cálculos estatísticos.

**“Faz forte ao cansado e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor.
Os jovens se cansam e se fatigam, e os moços de exaustos caem, mas os que
esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águia,
correm e não se cansam; caminham e não se fatigam.”**

Is. 40: 29-31

RESUMO

SPADA, D. T. A. **Detecção de bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em saliva/muco ou escarro em Centro de Referencia Ambulatorial para Tuberculose na Cidade de São Paulo:** Baciloscopia, cultura convencional e automatizada. 2009. 78 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O controle da tuberculose -TB no Brasil tem como objetivo a quebra da cadeia de transmissão através da baciloscopia de escarro para a descoberta dos casos e subsequentemente o tratamento. A baciloscopia de escarro é exame recomendado para diagnóstico e, durante o tratamento, nos segundo, quarto e sexto meses para um bom registro da evolução do quadro. A avaliação bacteriológica do diagnóstico e da evolução dos casos de TB depende da qualidade do material fornecido pelo paciente. O objetivo deste estudo foi à comparação da eficácia da baciloscopia e cultura de amostras de escarro e saliva/muco para a detecção de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (MTB) para diagnóstico e controle de tratamento da TB em indivíduos atendidos em Centro de Referencia Ambulatorial para Tuberculose na Cidade de São Paulo. As amostras clínicas foram previamente diferenciadas por citologia e submetidas à baciloscopia na detecção de Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR). As amostras foram analisadas *in natura* e concentradas coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e submetidas à cultura pelas metodologias tradicional e automatizada-MA. A identificação do grupo MTB baseou-se no crescimento em meio com PNB (Ácido para nitrobenzóico), e visualização do “Fator corda”. Do total de 374 amostras, 228 eram de pacientes sob diagnóstico inicial e 146 foram de pacientes em controle de tratamento. Foram caracterizadas 83 amostras de saliva /muco. Destas, sete foram positivas à baciloscopia sendo 03 (3,6 %) no material concentrado e uma (1,2 %) no material *in natura* ($p=0.5$ McNemar Test). Cinco amostras (6 %) foram positivas à cultura pelo método tradicional e 07 (8,4%) $p=0.5$ pelo MA. Como escarro, foram caracterizadas 291 amostras e 74 foram positivas na baciloscopia, sendo 34 (11,7 %) no material *in natura* e 45 (15,5 %) no material concentrado, $p=0.001$. Nas culturas, 56 (19, 2%) amostras de escarro foram positivas pelo método convencional e 67 (23 %) pela MA $p=0.001$. Das amostras de saliva/muco, o diagnóstico da TB pela cultura, ocorreu em 01 amostra. Um paciente em controle de tratamento apresentou positividade na baciloscopia e nas culturas em amostra de saliva/muco indicando possível falência do tratamento. O diagnóstico microbiológico da TB mostrou que a baciloscopia do sedimento do material clínico e a cultura pela metodologia automatizada foram mais sensíveis, independentemente da origem da amostra (escarro ou saliva/muco).

PALAVRAS - CHAVE: Tuberculose. Baciloscopia. Escarro. Saliva. Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

SPADA, D.T.A. **Detection of bacteria from *Mycobacterium tuberculosis* complex in saliva/mucus or sputum in Ambulatory Reference Center for tuberculosis in the city of São Paulo:** bacilloscopy, conventional and automated culture. 2009. 78 p. Thesis (Doctorate) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Control of tuberculosis –TB in Brazil has the objective to break off the transmission chain by the sputum bacilloscopy to discovery cases and subsequently treatment. The sputum bacilloscopy is an obligatory exam for diagnosis and is recommend during the treatment, in the second, forth and sixth months to register the evolution of the aspects of the disease. Bacteriology evaluation of diagnosis and evolution of TB cases depends of the material quality given by patients. The objective of this study was to compare effectiveness of bacilloscopy and culture of saliva/mucus and sputum samples for detection of mycobacteria from *M. tuberculosis* (MTB) complex for diagnosis and treatment control of TB in individuals attended in an Ambulatory Reference Center for tuberculosis in the city of São Paulo. Clinical samples were previously cytologic differentiated and submitted to bacilloscopy for detection of acid-alcohol resistant bacillus (BAAR). Samples were analyzed *in nature* and concentrated-stained by Ziehl-Neelsen method and submitted to culture by traditional and automated –AM methodologies. Identification of MTB group were based on growth in medium containing PNB (para nitrobenzoic acid), and visualization of cord factor. From the total of 374 samples, 228 were from patients with initial diagnosis and 146 from patients in treatment control. 83 samples from saliva/mucus were characterized. Seven of these were bacilloscopy positive, being 03 (3.6%) in concentrated material and one (1.2%) *in nature* material ($p=.500^a$ McNemar Test). Five samples (6%) were culture positive by traditional method and 07 (8.4%) $p=0.5$ for AM. For sputum, 291 samples were characterized and 74 were bacilloscopy positive, being 34 (11.7%) in *in nature* material and 45 in concentrated material, $p=0.001$. In culture, 56 (19.2%) samples of sputum were positive by conventional method and 67 (23%) for AM, $p=0.001$. From saliva/mucus samples, diagnosis of TB by culture, were in 01 sample. One patient in control of treatment presented positivity in bacilloscopy and culture in saliva/mucus sample, probably indicating treatment failure. Microbiological diagnostic of TB showed that bacilloscopy of material sediments and culture by automated methodology were more sensitive, independently of sample origins (sputum/mucus).

KEY WORDS: Tuberculosis. Bacilloscopy. Sputum. Saliva. *Mycobacterium tuberculosis* complex.

ABREVIATURAS

TB = Tuberculose

ZN = Ziehl-Neelsen

ES = Escarro

SM = Saliva/Muco

BAAR = Bacilos Álcool Ácido Resistentes

MA = Metodologia Automatizada = SISTEMA BACTEC-960[®]-MGIT[™] BECTON-DICKSON

L-J = Lowenstein Jensen

OMS = Organização Mundial da Saúde

MTB = *Mycobacterium tuberculosis*

CRPHF = Centro de Referencia Professor Helio Fraga

FUNASA = Fundação Nacional de Saúde

MNT = Micobactérias “não Tuberculosas”

MTB = Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

PNB = Ácido Paranitrobenzóico

ICF = Instituto Clemente Ferreira

SINAN = Sistema de informação de Agravos de Notificação

DOTS = Directly Observed Treatment Short Course

MS = Ministério da Saúde

PNCT = Programa Nacional de Controle da Tuberculose

WHO = World Health Organization

EUA = Estados Unidos da América

AIDS – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

TBMR – Tuberculose multirresistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	AMOSTRAGEM	26
3.2	CULTIVO	26
3.3	EXAME BACILÓSCOPICO	27
3.3.1	LÂMINAS DE ESFREGAÇO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	27
3.3.2	LÂMINAS DE SEDIMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	27
3.4	BACILOSCOPIA	27
3.4.1	METODOLOGIA DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN –ZN	27
3.4.2	BACILOSCOPIA DA AMOSTRA CLÍNICA PARA PESQUISA DE BACIOS ÁLCOOL ÁCIDOS RESISTENTES	28
3.5	CULTURAS	29
3.5.1	DESCONTAMINAÇÃO E NEUTRALIZAÇÃO DE MATERIAL CLÍNICO	29
3.5.2	CULTURA EM MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN	30
3.5.3	CULTURA AUTOMATIZADA	30
3.5.4	CARACTERIZAÇÃO PRESUNTIVA DE MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.	31
3.6	CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA DA AMOSTRA	31
3.6.1	COLORAÇÃO DE GRAM	32
3.6.2	COLORAÇÃO DE LEISHMAM	32
4	RESULTADOS	34
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	ANEXOS	55
	ANEXO A - LISTAGEM DOS ESPÉCIMES PROCESSADOS E RESULTADOS	56
	ANEXO B - PREPARO DOS REAGENTES	74
	ANEXO B.1 - MÉTODO DE PETROFF	74
	ANEXO B.2 - CORANTES PARA METODOLOGIA DE ZIEHL-NEELSEN	75
	ANEXO B.3 - MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN	76

ANEXO B.4-MEIO DE MIDDLEBROOK 7H9 DO SISTEMA AUTOMATIZADO	77
ANEXO B.5 - MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN COM PNB	77
ANEXO B.6-CULTIVO EM CALDO COM PNB NO MÉTODO AUTOMATIZADO	77

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, descoberto por Robert Koch, em 1882 (FIUZA DE MELO et al., 2006; DANIEL et al., 2005; DONOGHUE et al., 2004).

Apesar da TB ser doença milenar, continua um grave problema de saúde pública mundial, atingindo principalmente adultos jovens, na fase mais produtiva de suas vidas, elevando o custo social (KRITSKI et al., 2007; FREIRE e BONAMETTI e MATSUO, 2007; BRASIL, 2002).

Com o advento dos antibióticos na década de 40 o risco das doenças infecto-contagiosas começou a diminuir. Na década de 80, houve o maior declínio da incidência da tuberculose, especialmente nos países desenvolvidos, a ponto de se acreditar na sua erradicação. Atualmente, entretanto a incidência da doença atinge índices alarmantes, associada ao encontro de amostras multiresistentes, principalmente pelo aumento das aglomerações humanas, migração dos povos, aumento de imunossuprimidos e a ocorrência da AIDS (VILARIÇA et al., 2008; ROSEMBERG, 1999; RUFFINO NETTO, 1997; FIUZA DE MELO e AFIUNE, 1993).

A Organização Mundial de Saúde - OMS estima que o *Mycobacterium tuberculosis* infecta um terço da população mundial. Entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo, o Brasil está em 15 ° lugar. A cada ano, ocorrem 111.000 casos novos de TB e 6.000 óbitos no país. O Sistema de informação de Agravos de Notificação (SINAN / Ministério da Saúde - MS) recebeu, em 2001, 81.432 notificações de casos novos de TB, o que corresponde a um coeficiente de incidência de 47,2/100.000 habitantes (VIEIRA e GOMES, 2008; BIERRENBACH et al., 2007).

Em geral, a fonte de infecção é o indivíduo com a forma pulmonar da doença, eliminando bacilos. O conceito de transmissão por aerossol começou com o trabalho de William Wells, em 1941 que descreveu o conceito de partícula núcleo ou gotícula de Wells, que era uma partícula microscópica de aproximadamente 5 μ a 10 μ , que levitava no ar, enquanto as maiores se depositavam no chão (WELLS e LURIE, 1941). O risco da transmissão de infecção depende da quantidade de bacilos eliminados do doente e a exposição do contactante. Calcula-se que durante um ano, numa comunidade, uma fonte de infecção poderá infectar, em média, de 10 a 15 indivíduos sadios. A anulação das fontes de infecção, através da busca e tratamento correto dos doentes, é um dos aspectos estratégicos mais

importantes no controle da tuberculose (FREIRE et al., 2007; MENESES et al., 2006; BRASIL, 2002, 1994).

Aproximadamente 10% dos indivíduos infectados desenvolverão a doença por razões ainda pouco conhecidas. Alguns fatores, entretanto parecem interferir, entre eles a resposta imune do hospedeiro, a carga bacilífera recebida, o tempo de exposição com o doente, a virulência do bacilo. Dos 10% dos indivíduos que desenvolverão a TB, 5% desenvolvem nos dois primeiros anos após o contágio enquanto que os restantes em outro momento da vida (FIUZA DE MELO e AFIUNE, 1997).

O *Mycobacterium tuberculosis* é a espécie mais importante ao homem e pertence ao gênero *Mycobacterium* composto por mais de 100 espécies, sendo algumas patogênicas e a grande maioria não. As espécies patogênicas que compõem o Complexo *M. tuberculosis* (MTB), possuem maior importância médica e apresentam 99 % de similaridade de DNA. Pertencem ao complexo MTB: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* e o *M. microti*. Algumas novas espécies têm sido isoladas e, sua inclusão neste grupo, foram propostas. Entre elas: *M. canetti*, variante do *M. tuberculosis* encontrada na Somália, o *M. caprae*, agente infeccioso da tuberculose em caprinos e o *M. pinnipedii* causador da tuberculose em leões marinhos. Estas, podem eventualmente infectar o homem. Por diferirem quanto aos aspectos epidemiológicos, morfológicos, propriedades bioquímicas e a gravidade da doença nos animais experimentalmente inoculados, estas espécies de micobacterias do complexo MTB descritas acima estão taxonomicamente distintas (GIAMPAGLIA, 2007; VIANA-NIERO e LEÃO, 2004; COSMA, et al., 2003; COLLINS, 1995).

Os bacilos da tuberculose são bastonetes finos, aeróbios e de crescimento lento em meio de cultura. No Brasil e em grande parte do mundo o método mais utilizado para diagnóstico de TB é o exame direto do esfregaço do escarro *in natura* após coloração por Ziehl-Neelsen (ZN). A metodologia é viável para todos os níveis de complexidade laboratorial. Existem outros métodos de coloração como de Kinyoun (variante ZN, coloração sem aquecimento da fucsina) e coloração pela Auramina. Estas colorações têm como princípio pesquisar a álcool-acido-resistência do bacilo, que é a retenção da fucsina, mesmo após a lavagem do material na lâmina com solução de álcool-ácido. Esta propriedade está diretamente relacionada com os ácidos micólicos da parede celular que formam complexos estáveis com corantes como a fucsina e auramina. Desta maneira são designados de Bacilos Álcool Ácido Resistentes – BAAR (BRASIL, 2005; DIRETRIZES..., 2004; TARANTINO e ROSEMBERG, 1997; NOLTE e METCHOCK, 1995).

A pesquisa de BAAR no material clínico pela baciloscopia é um método pouco sensível, pois requer 5000 a 10000 de bacilos por ml de escarro. Esta limitação justifica a baciloscopia negativa em amostras paucibacilares. No entanto para a produção de colônias é necessário de 10 a 100 microrganismos viáveis por ml do escarro, portanto, a cultura oferece resultados mais precisos. A fluidificação e concentração pela centrifugação do material clínico permitem obter maior número resultados positivos pela baciloscopia. Existem diversos compostos que liquefazem o escarro; o Hipoclorito de Sódio ou mesmo NaOH a 4%, este utilizado também para descontaminação prévia do escarro para o cultivo (DELLA-LATTA e WEITZMAN, 1998; BRASIL, 1994; PALHARES, et al.,1996).

Vários meios de culturas são comercialmente disponíveis, sendo que o mais utilizado no Brasil e aprovado pela Organização Mundial da Saúde é o meio de Lowenstein Jensen (L-J). Trata-se de um meio sólido à base de ovo, que contém Glicerol e Asparagina como fontes de carbono e nitrogênio. As micobactérias, quando comparadas a outros microrganismos, são altamente exigentes no que se refere à nutriente. Por esta razão, os meios de cultivo e isolamento, incluindo o L-J, são extremamente ricos. Tais características facilitam o desenvolvimento de microrganismos contaminantes, portanto tornando indispensável o tratamento prévio da amostra clínica como o escarro e saliva/muco.

Apesar da disponibilidade de diversas metodologias de tratamento do escarro para a pesquisa de micobactérias, todas destroem bactérias contaminantes no material clínico, mas não as micobactérias. Além da atividade de descontaminação específica, o procedimento oferece atividade mucolítica, liquefazendo o material clínico facilitando sedimentação do bacilo que possui baixa gravidade específica pela alta quantidade de lipídios na parede celular. Assim existem: o método do Lauril Sulfato de Sódio, o Método de Corper & Stoner Modificado, o Método de Petroff, todos aprovados e recomendados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 1994, 2005). No Instituto Clemente Ferreira é utilizado rotineiramente, para esta descontaminação o método de Petroff. Este método utiliza o NaOH a 4% que destrói a microbiota contaminante e tem boa ação mucolítica. Utiliza-se um ácido para neutralizar o pH da suspensão controlado pela adição de um indicador. O procedimento é economicamente viável e mais simples aos outros. O método do Lauril Sulfato de Sódio, tem concentração de soda menor do que no método de Petroff (PETROFF, 1951; BRASIL, 2005, 1994; BALIAN et al., 2002).

Várias são as metodologias disponíveis no aprimoramento do diagnóstico da tuberculose, minimizando principalmente o tempo de obtenção de resultados, e aumentando-se a sensibilidade.

Desta maneira diversos métodos de diagnóstico rápido foram propostos, principalmente os métodos de diagnóstico molecular e por imunofluorescência. Neste contexto incluem os métodos de custo elevado pelos equipamentos, reagentes, sua manutenção. Mesmo com este avanço ocorrem falhas inerentes das metodologias pelos reagentes ou pelas técnicas (SARMIENTO et al., 2003). O custo elevado destas metodologias apesar de eficazes, também não foram amplamente aplicadas na rotina diagnóstica da TB principalmente no que se refere às instituições governamentais.

Os fatores econômicos ainda são os principais motivos para o uso das técnicas convencionais de exames de baciloscopia e de cultivo. Vale lembrar que a baciloscopia é um exame simples barato e rápido, mas de baixa especificidade, pois não distingue as espécies de micobactérias descritas na literatura (BROOKS et al., 1995).

A baciloscopia do escarro apresenta baixa sensibilidade principalmente pela deficiência de coleta adequada de material clínico e por exigir maior número de bacilos por ml de amostra para que seja detectável. A sensibilidade da baciloscopia nas formas pulmonares cavitárias, é de aproximadamente 80%, já as formas infiltrativas, esta sensibilidade diminui para 32% (RIBEIRO et al., 1995; GREENBAUM et al., 1980).

O resultado de culturas, em meio sólido Lowenstein Jensen, apesar de constituir o padrão ouro no diagnóstico microbiológico da TB, por apresentar maior sensibilidade do que a baciloscopia ainda pode apresentar resultados falsos negativos. A sensibilidade da cultura varia de 30% a 96%, enquanto a especificidade é alta e mantém-se de 98,4% a 100%. O tempo de resultado laboratorial dos métodos de cultivo tradicionais é lento. Nesta percepção o cultivo é mais lento no meio sólido e mais rápido nos meios líquidos. O tempo extenso na detecção das micobactérias pela cultura e os resultados falsos negativos pela baciloscopia ou cultura são incompatíveis com a urgência de controle e tratamento da doença (DIRETRIZES..., 2004; LEVY et al., 1989).

Visando diminuir o tempo de cultivo de micobactérias de material clínico, em 1977, foi desenvolvido o sistema semi-automatizado radiométrico conhecido como BACTEC 460® AFB System (Becton Dickinson). O procedimento indicava o desenvolvimento bacteriano pela concentração de gás carbônico radioativo produzido pelo crescimento da micobactéria em meio de Middlebrook 7H9, com ácido palmítico marcado com carbono 14 (BECKTON DICKINSON, 1985).

Outro sistema automatizado é o preconizado pela ORGANON TECNICA®, é basicamente composto por um sensor colorimétrico separado do meio de cultura por membrana gás-permeável. No crescimento de micobactérias, há produção de dióxido de

carbono pela metabolização dos substratos do meio de cultura. A produção de gás carbônico pelos microrganismos é revelada por um indicador que muda de cor verde escuro para amarelo claro (CRUMP et al., 2003).

Posteriormente a BECTON DICKINSON desenvolveu outro sistema para detecção de micobactérias, utilizando-se de metodologia totalmente automatizada, não radioativa, o BACTEC-960®-MGIT™, (MA). Esta metodologia (MA) utiliza o TUBO MGIT® (Mycobacteria Growth Indicator tube) que contém meio de Middlebrook 7H9 com sais de rutênio marcados com fluorocromo que emite luz em baixas concentrações de oxigênio. Uma célula fotoelétrica avalia, a cada hora, a luminescência dos tubos, que correspondem à quantidade de oxigênio consumido pelos microrganismos, registrando os resultados positivos. Neste momento o crescimento de micobactérias no caldo é confirmada presuntivamente pela baciloscopia de uma alíquota da cultura corada pelo método de ZN, para detecção de BAAR. A observação microscópica de formações de agrupamentos serpentiformes “Fator corda” pelos bacilos é utilizada para confirmação presuntiva de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (COELHO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2003; BECTON-DICKINSON, 1998).

A eficácia deste método de cultura apresenta semelhança significativa com a metodologia que utiliza o meio de Lowenstein Jensen. De fato este aspecto foi verificado em estudo realizado, em 1999, no Instituto Clemente Ferreira, em que percentuais de positividade foram de 35% para cultura em meio de L-J e 37% para a metodologia, do MA. A rapidez na caracterização de cultura positiva é notória. O protocolo para negatividade é de 42 dias em comparação aos 60 dias pelo método convencional e a grande maioria das culturas tem o tempo médio de crescimento entre 6 e 12 dias, enquanto no L-J é de aproximadamente 30 dias (ALMEIDA et al. , 2005; BECTON DICKINSON, 1998).

Após isolamento, pode-se separar o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* das demais micobactérias realizando um sub-cultivo em meio de cultura com o PNB (ácido para nitrobenzóico). As micobactérias não tuberculosas em geral são resistentes, e as espécies do complexo MTB são sensíveis, excetuando algumas estirpes de *M. kansasii*, *M. gastri* e *M. marinum*. O tempo de incubação, para este teste em meio sólido de LJ é de 20 dias. Atualmente, a metodologia automatizada BACTEC-960®-MGIT™, já possibilita a realização desse teste, com redução significativa do tempo de incubação, 7 a 12 dias (GIAMPAGLIA, 2007; BRASIL, 2005; BECTON DICKINSON, 1998; TSUKAMURA, 1965).

O Ministério da Saúde do Brasil, em 2004, aprovou as diretrizes Brasileiras para Tuberculose (DIRETRIZES..., 2004), onde afirma-se que a pesquisa bacteriológica é prioritária para o diagnóstico da TB, pois permite a identificação das fontes de infecção.

Além da recomendação da baciloscopia para diagnóstico da TB, preconiza-se realização mensal da baciloscopia de controle de tratamento, sendo que o Ministério da Saúde considera indispensável à avaliação do material clínico ao segundo, quarto e sexto meses de tratamento (DIRETRIZES..., 2004). A limitação para a obtenção de amostra clínica adequada e consequente pequena quantidade de bacilos somam-se a algumas limitações dos métodos convencionais. Esta problemática embora conhecida é pouco lembrada principalmente aos indivíduos com dificuldade na obtenção do escarro. Assim temos: crianças, adolescentes, indivíduos em tratamento eficaz e principalmente mulheres mesmo com doença clínica em evidência que não conseguem obter o escarro. Adicionalmente, a falta orientação e conscientização dos funcionários que atendem os pacientes, por meio de expressões de rejeição ao material clínico, inibem os pacientes em obter amostras adequadas. Neste contexto são enviadas amostras inadequadas, sendo a saliva e muco o principal material disponível e inadequado ao diagnóstico da doença (BRASIL, 2002; CENTRO DE VIGILÂNCIA..., 2002).

No passado o escarro era obtido de coletas sucessivas no mesmo frasco de amostras de 24hs visando à obtenção de maior concentração de micobactérias para maximizar a possibilidade de cultivo e isolamento. Entretanto atualmente as técnicas de obtenção de micobactérias viáveis não requerem este tipo de material além deste propiciar eminentemente o crescimento de microrganismos da microbiota normal e prejudicar o diagnóstico microbiológico (KESTLE et al., 1967).

A coleta de material pela manhã é recomendada por causa da movimentação ciliar noturna, que impulsiona o muco até a faringe para manter úmidas as vias aéreas. Da faringe, o muco é deglutido ou expelido pela tosse. Portanto a possibilidade da presença de BAAR é maior, quando esta coleta é realizada logo ao acordar pela maior concentração do muco neste momento do dia (BRASIL, 2005; GUYTON; HALL, 1997).

Uma amostra clínica insuficiente ou inadequada interfere no resultado final do diagnóstico microbiológico. Incluem-se outras variáveis como o preparo inadequado do esfregaço, o erro na coloração, a falta de treinamento ou experiência do bacterioscopista em identificar BAAR. Desta maneira apesar da OMS, há 35 anos, indicar a baciloscopia de escarro como base para o diagnóstico da TB é necessário considerar os novos desafios de

controle da doença incluindo-se a revisão e adequação da metodologia diagnóstica (BRASIL, 2005; OPAS/OMS 1978; OMS 1974).

Em 1993 a OMS, declarou a TB como emergência global e recomendou a estratégia denominada DOTS (Directly Observed Treatment Short Course), que, entre outras medidas, inclui o tratamento supervisionado. O objetivo era aumentar a detecção e a adesão ao tratamento, proporcionando melhores taxas de cura e, conseqüente diminuição da transmissão do bacilo. Em 2004 o tratamento supervisionado no Brasil atingia 24,1% dos casos nas capitais e regiões metropolitanas (SANT'ANNA, 2007; KRITSKI et al., 2007; SANTOS, 2007).

Em 2006 foi publicado pela OMS outro plano de controle mundial da TB a STOP TB PARTNERSHIP – a visão do mundo livre de TB. Este plano amplia e aperfeiçoa a estratégia DOTS com a melhoria no diagnóstico microbiológico por meio de garantia de bacteriologia de qualidade (KRITSKI et al., 2007; WHO, 2006).

Preconiza-se que para verificação da origem brônquica de uma amostra de escarro, material adequado para pesquisa microbiológica da TB, o material deve ser analisado também pela Coloração de Gram e verificada a relação entre o número de células epiteliais e ao número de leucócitos. O escarro que é definido como material inflamatório das vias aéreas inferiores, possui portanto, maior proporção de leucócitos em relação às células epiteliais por campo microscópico observado (OPLUSTIL 2000; ISABERL 1992; DANIEL, 1983; CHODOSH 1970).

Entre as maneiras de garantir a qualidade da amostra está a da indução do escarro pela inalação com solução de salina hipertônica (3%). Esta técnica, é conhecida e utilizada para pesquisa de outros agentes infecciosos de doenças pulmonares. O procedimento é bastante útil para o diagnóstico microbiológico da TB, mas requer medidas de biossegurança adequadas, visto que tal procedimento de indução de escarro pode provocar tosse e contaminação da sala, que na maioria das vezes nas unidades de saúde são também utilizadas para outros procedimentos, como inalação de medicamentos para pacientes asmáticos, muitos deles crianças (MARNEILI et al., 2004; DIRETRIZES..., 2004; BRASIL, 2002).

Diante da problemática evidenciada no diagnóstico e durante o tratamento da TB, o acompanhamento bacteriológico torna-se indispensável, principalmente em unidade de referência ambulatorial terciária como o Instituto Clemente Ferreira (ICF). Assim classificado por tratar pacientes portadores de tuberculose multirresistente (TBMR) a qual é definida no Brasil, como resistência *in vitro* a pelo menos rifampicina e isoniazida e a mais um ou mais dos medicamentos componentes dos esquemas terapêuticos. A unidade também atende

pacientes de outros serviços governamentais ou não, com tratamentos inadequados, imunossuprimidos e que necessitam de avaliação clínica e laboratorial eficiente. O ICF registrou nos anos de 2005 e 2006, a média de 650 pacientes/ano de tuberculose, sendo 540 tuberculose pulmonar não tratada, com 130 (2,4%) de retratamento (Serviço de Vigilância Epidemiológica - Informação Verbal¹).

O presente estudo visou comparar a eficácia das metodologias diagnósticas da TB: baciloscopia e cultura, de escarro e saliva/muco em uma referência ambulatorial terciária o Instituto Clemente Ferreira (ICF) capaz de prestar serviços de alto grau de complexidade para TB na cidade de São Paulo (BRASIL, 2007).

¹ Serviço de Vigilância Epidemiológica do Instituto Clemente Ferreira da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo.

2 OBJETIVOS

Comparação da eficácia da baciloscopia e cultura de amostras de escarro e saliva/muco para a detecção de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (MTB) para diagnóstico e controle de tratamento da TB em indivíduos atendidos em Centro de Referência Ambulatorial para Tuberculose na Cidade de São Paulo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas amostras de material coletado das vias aéreas de pacientes com suspeita de TB ativa, para diagnóstico bacteriológico ou em tratamento de tuberculose. As amostras da rotina laboratorial foram disponibilizadas para o estudo em frascos de coleta específicos e codificados. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa para humanos do ICB-USP. O estudo foi realizado de Junho a Outubro de 2007.

3.1 AMOSTRAGEM

As amostras foram colhidas em frascos plásticos, com tampa rosqueada, a identidade do paciente não foi disponibilizada. Posteriormente o Serviço de Vigilância Epidemiológica (Informação Verbal - Nota¹) do Instituto Clemente Ferreira informou se a amostra era para diagnóstico ou acompanhamento do tratamento.

Foram estudadas 374 amostras clínicas de escarro - ES ou saliva/muco - SM que não apresentaram contaminação por outras bactérias ou por micobactérias não pertencentes ao complexo MTB. Foram estudadas a primeira e a segunda amostra de cada paciente. As amostras foram divididas em 228 para o diagnóstico inicial e 146 para o controle de tratamento.

3.2 CULTIVO

Para o cultivo e isolamento das micobactérias, as amostras clínicas foram descontaminadas pelo método de Petroff e inoculadas em meio de Lowenstein Jensen (L-J) e em caldo Middebrok 7H9 para o Método Automatizado (MA), (BRASIL, 2005, 1994).

Foi utilizada como controle de eficácia dos meios de cultura a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294. O preparo e manutenção dos reagentes e meios de cultura, procedimentos de cultivo e sub-cultivo e protocolos de biossegurança foram realizados de acordo com as normas descritas no Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 2005, 1994). A cultura pelo método automatizado seguiu as normas do fabricante (BECTON DICKINSON 1998).

Os resultados obtidos foram tabulados e estatisticamente analisados (McNemar test) utilizando-se do programa estatístico SPSS Versão 15.

3.3 EXAME BACILOSCÓPICO

3.3.1 LÂMINAS DE ESFREGAÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

1. Em fluxo laminar as amostras clínicas nos frascos de coleta , foram ordenadas ao lado de lâminas limpas e desengorduradas.
2. Com um auxílio de aplicador de madeira dividido em dois e com pontas farpadas, foi selecionada a alíquota com maior densidade e ou mais purulenta. Na existência de poucas ou pequenas partículas adequadas para a análise selecionou-se uma alíquota da mistura da amostra.
3. Este material foi transportado para a lâmina e estendido até o final com a ajuda do aplicador em movimentos de “vai e vem”, de modo que o esfregaço ocupasse dois terços da lâmina. O excesso de material no aplicador foi descartado e descontaminado em autoclave.
4. As lâminas foram secadas na temperatura ambiente.
5. Em seguida o material foi fixado aquecendo-se rapidamente três vezes o esfregaço com auxílio de uma chama de fogo (bico de Bunsen) .
6. Após este procedimento o material foi corado pelo método de Ziehl-Neelsen (BRASIL, 2005).

3.3.2 LÂMINAS DE SEDIMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram confeccionadas quando da realização da cultura, após a descontaminação pelo método de Petroff das amostras. Este método utiliza Hidróxido de Sódio a 4%, que destrói grande percentagem de bactérias contaminantes, além de liquefazer o material. Este foi posteriormente centrifugado e neutralizado, sendo o sedimento semeado em meio de cultura e utilizado para a confecção das lâminas.

3.4 BACILOSCOPIA

3.4.1 METODOLOGIA DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN- ZN

A coloração pelo método de ZN foi realizada conforme descrito:

1. A lâmina com o esfregaço fixado, foi coberta com solução de fucsina fenicada a 0,3% (Anexo B - Preparo de Reagentes)
2. O conjunto foi aquecido até emissão de vapores, por três vezes durante 5 minutos, após este tempo foi lavada em água corrente.
3. Em seguida a lâmina foi coberta com solução de álcool/ácido clorídrico (Anexo B - Preparo de Reagentes) por um período de 2 minutos e lavado em água corrente.
4. Como corante de fundo aplicou-se solução de azul de metileno a 0,1% (Anexo B - Preparo de Reagentes) por 30 segundos.
5. Este último corante foi removido com água e secado a lâmina em temperatura ambiente para análise baciloscóica foi utilizado o microscópio óptico comum e objetiva de imersão (BRASIL, 2005).

3.4.2 BACILOSCOPIA DA AMOSTRA CLINICA PARA PESQUISA DE BACILOS ÁLCOOL ÁCIDO RESISTENTES

A Baciloscopia foi realizada em microscópio óptico comum com objetiva de imersão resultando em aumento de 1000 X. Os critérios para a interpretação dos resultados da baciloscopia diferem quando se trata de lâmina de esfregaço e lâmina de sedimento (BRASIL, 2001, 2005). No caso de lâmina de esfregaço pesquisou-se a presença de BAAR em 100 campos. Os resultados foram tabulados baseando-se nos seguintes Parâmetros:

O resultado foi expresso em cruces:

- (-) Negativo = não foram encontrados BAAR em 100 campos
 - (n) de Bacilos quando são encontrados somente de 1 a 9 BAAR em 100 campos
 - (+) menos de 01 BAAR por campo em 100 campos observados
 - (++) de 01 a 10 BAAR por campo em 50 campos observados
 - (+++) mais de 10 BAAR por campo em 20 campos observados
- Ou números de Bacilos em mais de 100 campos.

No caso da lâmina de sedimento pesquisou-se a presença de BAAR em 300 campos microscópicos (BRASIL, 2001). Os resultado foram tabulados baseando-se nos seguintes Parâmetros:

- (-) Negativo = não foram encontrados BAAR em 300 campos observados
- (n) de Bacilos quando são encontrados somente de 1 a 9 BAAR em 300 campos
- (+) Total de 10 a 99 BAAR em 300 campos observados
- (++) de 1 a 10 BAAR por campo em 200 campos observados

(+++)) mais de 10 BAAR por campo em 100 campos observados

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com normas contidas no Manual de bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 2005, 2001, 1994).

3.5 CULTURAS

O material clínico para o cultivo de micobactérias foi previamente descontaminado pelo método de Petroff, procedimento rotineiro utilizado no laboratório do Instituto Clemente Ferreira, e seguiu as normas do Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Após a descontaminação a suspensão foi neutralizada quanto ao PH e semeada concomitantemente nos meios de culturas de L-J e no meio de Middlebrook 7H9 utilizado no sistema automatizado (BRASIL, 1994, 2005; BECTON DICKINSON, 1998).

Com auxílio da coloração de ZN confirmou-se à presença de BAAR nas culturas positivas, observando a formação de agrupamentos em formas serpentiniformes “Fator corda”. A ausência de crescimento dos BAAR previamente isolados e semeados em meio com ácido paranitrobenzóico (PNB), caracterizou fenotipicamente a presença de micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, juntamente com a visualização do “Fator corda” (COELHO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2003; BRASIL, 2005, 1994; BECTON DICKINSON, 1998).

3.5.1 DESCONTAMINAÇÃO E NEUTRALIZAÇÃO DE MATERIAL CLÍNICO

O método escolhido foi o de Petroff. Deste modo às amostras clínicas foram transferidas para tubos cônicos de polipropileno com tampa de rosca e de capacidade de 50 ml e adicionadas a NaOH 4% na proporção de 1:1. Em seguida foi homogeneizada com o auxílio do vórtex (agitador), e incubada em estufa a 37 °C, mantendo homogeneizações por 15,20 até no máximo 30 minutos. Água destilada v/v foi adicionada com a finalidade de reduzir a viscosidade e diluir o excesso do NaOH e aumentar a eficácia da centrifugação. A suspensão foi neutralizada, gotejando a solução de ácido clorídrico 1 N contendo 0,004% de vermelho de fenol, até a ocorrência da cor âmbar. Após estes procedimentos centrifugamos o material por 20 minutos a 3000 g. Aguardamos 5 minutos antes de abrir a centrífuga para evitar contaminação com aerossóis. O sobrenadante foi removido. O sedimento foi utilizado para semeadura em meio de L-J e em meio de Middlebrook 7H9 (método automatizado).

Do sedimento também foi confeccionada uma lâmina para a pesquisa de BAAR (Lâmina de Sedimento), (BRASIL, 2005, 1994).

3.5.2 CULTURA EM MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN

O cultivo em meio de Lowenstein Jensen, seguiu o seguinte protocolo:

Um Volume de 0,5 ml do sedimento descontaminado e neutralizado foi semeado nos tubos com meio de cultura de Lowenstein Jensen, logo após foram colocados em bandeja inclinada deixando parcialmente aberto. Foi Levada a estufa a 37 °C. Após +/- 3 dias os tubos foram fechados.

Foram feitas leituras semanais até a 6ª semana, os tubos positivos foram retirados e informado os resultados segundo a escala semiquantitativa abaixo:

(+) 20 a 100 colônias

(+ +) Colônias separadas (mais de 100)

(+++) Colônias confluentes

(0) Sem crescimento

(C) Contaminado

(Negativa) sem crescimento com 60 dias de incubação

Dos tubos positivos foram feitas lâminas e coradas em ZN para confirmação da positividade para BAAR (BRASIL, 2005, 1994).

3.5.3 CULTURA AUTOMATIZADA

O material a ser semeado foi previamente descontaminado pelo método de Petroff.

O cultivo em meio líquido, seguiu o seguinte protocolo:

Foram inoculados 0,5 ml do sedimento da amostra descontaminado e neutralizado em tubos do sistema BBL™MGIT™ 960. Cada tubo possui 7ml de caldo Middlebrook 7H9/ Caseína-Peptona e Glicerol, acrescidos de 0,8 ml de PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidixo, Trimetoprim e Azlocilina) e 110 µl de indicador fluorescente e enriquecido com OADC (Albumina bovina, Dextrose, Catalase e Ácido oléico). Os tubos possuem também uma atmosfera com 10% de CO₂. Esses tubos foram incubados em estufa a 37 °C, pertencente ao sistema BBL™MGIT™ 960.

A cada 60 minutos esses tubos eram testados quanto ao consumo de O₂ e densidade óptica. As culturas positivas eram avaliadas, indicadas no aparelho e exibidas no monitor por

uma luz indicativa e alarme. O resultado do teste foi registrado e impresso em dias, horas e minutos

Após a detecção de culturas positivas, os tubos eram analisados para confirmação da presença de BAAR pela coloração de ZN, “Fator corda” seguido de isolamento e identificação das micobactérias (COELHO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2003; BECTON DICKINSON, 1998).

3.5.4 CARACTERIZAÇÃO PRESUNTIVA DE MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

Os isolados das culturas foram semeados novamente em L-J contendo PNB (500 µg/ml) ,e em um tubo de L-J sem a presença do agente inibidor para controle, e incubado a 37 °C por 28 dias. O mesmo foi realizado em meio de Middlebrook 7H9 sem e com agente inibidor na metodologia automatizada. A leitura para interpretação do L-J foi realizada após 28-30 dias de incubação a 37 °C. Foi considerado Sensível o cultivo das colônias com crescimento não superior a 1% do obtido no tubo controle (sem PNB) e Resistente quando o cultivo foi superior a 1%. A interpretação de PNB resistente ou sensível no método automatizado seguiu as normas do fabricante.

A interpretação do resultado foi a seguinte: PNB sensível característica fenotípica de micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (BRASIL, 2005, 1994 ; BECTON DICKINSON, 1998).

3.6 CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA DA AMOSTRA

Para a caracterização da amostra como escarro ou saliva/muco duas lâminas de esfregaço (seção 3.3.1) da amostra *in natura* foram confeccionadas e coradas pelos métodos de Leishman e gram respectivamente, para observação da quantidade de leucócitos em relação a células epiteliais, (objetiva 10X), e verificação se o material era procedente do trato respiratório inferior, material inflamatório, ou se tratava de saliva/muco.

Ao observar em objetiva 10X em pelos menos 10 campos microscópicos, as amostras foram classificadas em:

Amostras de escarro: apresentam menos de 10 células epiteliais/campo e mais de 25 leucócitos/campo (Fig. 1A e 1B)

Amostras de saliva/Muco: apresentam mais de 10 células epiteliais/campo e menos de 25 leucócitos/campo (Fig. 2A e 2B) (OPLUSTIL, 2000; ISABERL, 1992)

3.6.1 COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de gram foi realizada conforme a seguir:

1. A lâmina foi recoberta com solução de Cristal Violeta por um minuto.
2. A seguir o excesso de corante foi desprezado.
3. Ainda sem lavar a preparação, a lâmina foi recoberta com uma solução de Álcool-Acetona e lavada com esta solução até que a cor roxa deixasse de desprender-se.
4. Em seguida foi lavada com água corrente.
5. Logo a seguir a lâmina foi recoberta com uma solução de Fucsina Fenicada de Gram, durante 30 segundos.
6. Foi escoado o corante, e lavada a lâmina em água corrente.
7. A secagem foi natural (RUIS, 1999).

A lâmina de esfregaço corada por gram foi examinada em objetiva de 10x e a quantidade de leucócitos em proporção à quantidade de células epiteliais foi observada. Quando porventura surgia dúvida sobre alguma estrutura, a observação era feita em objetiva de imersão.

3.6.1 COLORAÇÃO DE LEISHMAN

A coloração de Leishman conforme foi realizada conforme o descrito a seguir

1. A lâmina foi coberta com o corante de Leishman
2. O corante foi deixado sobre a lâmina por 1 minuto para fixação
3. Foi distribuído sobre a lâmina de 15 a 20 gotas de água ou solução tampão.
4. Foi Homogeneizado a mistura água – leishmam, usando uma pipeta para soprar sobre o corante, ficando por 3-4 minutos sobre a lâmina.
5. Após estes procedimentos a lâmina foi lavada em água corrente e limpa a parte contrária ao esfregaço com uma gaze

A lâmina de esfregaço corada por Leishmam foi examinada em objetiva de 10x e a quantidade de leucócitos em proporção à quantidade de células epiteliais foi observada.

Quando porventura surgia dúvida sobre alguma estrutura, a observação era feita em objetiva de imersão (WOESSNER, 1990).

4 RESULTADOS

No total de 374 amostras clínicas a diferenciação citológica do material comprovou que 291 (77,8%) eram escarro e 83 (22,2%) saliva/muco. (Tabela 1 e 2; Anexo A ; Fig. 1A, 1B, 2A, 2B).

Figura 1A – Microscopia ótica em objetiva de imersão, aumento de 1000X. Coloração de Gram de amostra caracterizada como escarro. Observa-se a predominância de leucócitos.

Figura 1B – Microscopia ótica em objetiva de imersão, aumento de 1000X. Coloração de Leishman de amostra caracterizada como escarro. Observa-se a predominância de leucócitos.

Fig. 2A – Microscopia ótica em objetiva de imersão, aumento de 1000X, coloração de Gram de amostra caracterizada como saliva. Observa-se a predominância de células epiteliais

Fig. 2B - Microscopia ótica em objetiva de imersão, aumento de 1000X. Coloração de Leishman de amostra caracterizada como saliva. Observa-se a predominância de células epiteliais.

Tabela 1 – Número de baciloscopias positivas e negativas na detecção de BAAR em lâmina com sedimento e de esfregaço de material *in natura* nas amostras caracterizadas como escarro ou saliva/muco

	Lâmina de Sedimento			Lâmina de Esfregaço		
	Positiva	Negativa	Total	Positiva	Negativa	Total
Escarro	45 (15,5%)	246 (84,5%)	291 (77,8%)	34 (11,7%)	257 (88,3%)	291 (77,8%)
Saliva/Muco	03 (3,6%)	80 (96,4%)	83 (22,2%)	01 (1,2%)	82 (98,8%)	83 (22,2%)
Total de amostras			374 (100%)			374 (100%)

Do total de amostras de escarros quarenta e cinco (15,5%) revelaram na baciloscopia a presença de BAAR, sendo 34 (11,7%) nas lâminas de esfregaço e todas as 45 (15,5%) no sedimento. As amostras de escarros negativas das 291 foram 257 (88,3%) em lamina de esfregaço e, 246 (84,5%), o foram nas lâminas de sedimento. Trinta e quatro amostras apresentaram resultado positivo em ambas as metodologias (Tabela 1; Fig. 1A , 1B e 3).

Fig. 3 Microscopia ótica em objetiva de imersão, aumento de 1000X, Lâmina de sedimento de amostra de escarro em coloração de Ziehl-Neelsen, observamos a presença de muitos BAAR .

Das 83 amostras caracterizadas como saliva/muco (Figura, 2A, 2B e 4), 3 apresentaram BAAR, sendo 01 (1,2%) em lâmina de esfregaço direto e todas as 03 (3,6%) no sedimento, uma das amostras apresentou positividade na lâmina de esfregaço e na lâmina de sedimento, (Tabela 1; Fig. 2A, 2B e 4).

Fig. 4 Microscopia ótica em objetiva de imersão, aumento de 1000X, Lâmina de sedimento de amostra de saliva/muco em coloração de Ziehl-Neelsen, observamos a presença de BAAR .

Comparando os resultados positivos e negativos nas amostras de saliva/muco não houve diferença estatística significativa pelo o teste de McNemar ($p=0.5$). No entanto as amostras de escarro apresentam positividade maior comparando-se com as amostras negativas ($p=0.001$).

Das 291 amostras de escarro 67 (23%) apresentaram positividade em exames de cultura. Destas 56 (19,2%) apresentaram positividade em L-J e todas (23%) em MA, sendo que 235 (80,8%) amostras apresentaram resultado negativo em Lowenstein Jensen e 224 (77%) amostras no MA (Tabela 2; Fig. 5 e 6).

Tabela 2 – Resultados das Culturas para *M. tuberculosis* em meio de Lowenstein Jensen e no método automatizado das amostras de Escarro e Saliva / Muco

	Lowenstein Jensen			Método Automatizado		
	Positiva	Negativa	Total	Positiva	Negativa	Total
Escarro	56 (19,2%)	235 (80,8%)	291 (100%)	67 (23%)	224 (77%)	291 (77,8%)
Saliva/Muco	05 (6%)	78 (94%)	83 (22,2%)	07 (8,4%)	76 (91.6%)	83 (22,2%)
Total de amostras			374 (100%)			374 (100%)

As amostras caracterizadas como saliva foram 83. Destas, sete (8,4%) foram positivas à cultura em MA, sendo apenas 5 (6%) positivas em L-J. Setenta e seis (91.6%) foram negativas em ambos os métodos estudados. De todas as culturas positivas foram confeccionadas lâminas e coradas em Ziehl-Neelsen para pesquisa de fator corda característica do Complexo *M. tuberculosis* (COELHO et al. , 2007; MONTEIRO et al., 2003), (Tabela 2; Fig. 5 e 6).

Fig. 5 Microscopia ótica em objetiva de imersão, aumento de 1000X, Lâmina de cultura em meio de Middlebrook 7H9 com coloração de Ziehl-Neelsen. Observamos a presença de BAAR isolados e agrupados em formações serpentinares “Fator Corda”.

Fig. 6 Microscopia ótica em objetiva de imersão, aumento de 1000X, Lâmina de cultura em meio de Middlebrook 7H9 com coloração de Ziehl-Neelsen. Observamos a presença de BAAR isolados e agrupados em formações serpentinares “Fator Corda”.

O teste de McNemar apresentou os seguintes resultados: $p=0.001$ para as amostras de escarro e $p=0.5$ para as amostras de saliva/muco.

Dos 7 pacientes que apresentaram saliva/muco positivas em alguma das metodologias estudadas para isolamento de BAAR, apenas o paciente 1 apresentou amostra clínica coletada após início do tratamento (controle de tratamento) as demais foram solicitadas para diagnóstico da doença. Cinco pacientes, além das salivas, também apresentaram amostras de escarro positivas no período do estudo.

A tabela 3 mostra o resultado destes pacientes, em cada uma das metodologias utilizadas no estudo (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados descritivos dos sete pacientes que apresentaram amostra positiva para BAAR de saliva/muco

Pacientes	Tipo de Amostra	Baciloscopia		Cultura	
		Esfregaço	Sedimento	LJ	MA
Paciente 1	Amostra 1951 Saliva /muco	(+)	(+)	(+++)	Positiva
Paciente 2	Amostra 2241 Saliva /muco	Neg	05 Baar	(++)	Positiva
	Amostra 2229 Escarro	(+)	(++)	(+++)	Positiva
Paciente 3	Amostra 1852 Saliva / muco	Neg	Neg	Neg	Positiva
	Amostra 1919 Escarro	Neg	(+)	(+)	Positiva
Paciente 4	Amostra 2083 Saliva /muco	Neg	03 baar	(+)	Positiva
	Amostra 2126 Escarro	Neg	Neg	03 colônias	Positiva
Paciente 5	Amostra 2331 Saliva / muco	Neg	Neg	09 colônias	Positiva
	Amostra 2271 Escarro	Neg	Neg	11 colônias	Positiva
Paciente 6	Amostra 2058 Saliva / muco	Neg	Neg	Neg	Positiva
	Amostra 2057 Escarro	Neg	Neg	Neg	Positiva
Paciente 7	Amostra 2989 Saliva / muco	Neg	Neg	(+)	Positiva

5 DISCUSSÃO

As micobactérias têm sido isoladas de vários materiais clínicos humanos, animais e de algumas amostras ambientais. Nos humanos o escarro é o material mais frequentemente analisado, mas analisam-se lavados brônquicos, lavados bronco-alveolares, urina, fezes, lavados gástricos, sangue, líquido, fragmentos de tecidos e aspirados de linfonodos. As micobactérias possuem velocidade de crescimento de aproximadamente 18 hs comparada por exemplo aos 20 minutos de algumas enterobactérias. Desta maneira algumas amostras clínicas contaminadas com a microbiota normal devem ser previamente tratadas por métodos de descontaminação seletiva, destruindo a microbiota contaminante, mas mantendo-se a viabilidade das possíveis micobactérias para o sucesso de seu cultivo e isolamento (BRASIL, 2005).

Na década de 90, dois terços das publicações científicas com micobactérias, relacionava-se principalmente com o seu diagnóstico molecular. Na época iniciou-se a detecção de amostras de micobactérias multiresistente que por sua vez alertavam a comunidade. A hibridização com sonda para RNA e a Reação da Polimerase em Cadeia, na detecção indireta destas bactérias, as metodologias mostraram-se muito úteis e resultaram em conjuntos comerciais (*kits*) de diagnóstico rápido e preciso (BENNEDSEN et al., 1996). Com a necessidade de obter isolados para os dados epidemiológicos, estudo da sensibilidade aos antimicobacterianos e outros procedimentos que necessitam da célula bacteriana viável, além dos métodos convencionais de cultivo e isolamento aplicaram-se métodos automatizados para atender a demanda e a urgência dos resultados laboratoriais (KRITSKI et al., 2000, ALMEIDA et al., 2005)

Os métodos de diagnóstico molecular apresentam ainda imperfeições principalmente no que se refere na precisão de resultados de acordo com Sarmiento, 2003. Apresentam elevada sensibilidade (95%) e especificidade (98%) em amostras com baciloscopia positiva, sendo o seu rendimento inferior em amostras com baciloscopia negativa (SARMIENTO et al., 2003).

As Diretrizes Brasileiras para Tuberculose (DIRETRIZES..., 2004) recomendam a não substituição da cultura pela técnica de PCR. Alertando que seu uso deverá ser restrito aos laboratórios de referência, isto é laboratórios de maior complexidade, em casos de urgência de diagnóstico.

Os métodos de diagnóstico molecular e a sua manutenção ainda resultam em custo elevado prejudicando a sua aplicação em países com nível sócio econômico reduzido (CATANZARO et al., 2000).

A limitação no diagnóstico rápido de doenças debilitantes ou que diminuem o tempo de vida saudável como a TB expõe o Brasil entre os países que mais possuem este tipo de problemática social.

A orientação operacional rotineira no controle de TB no Brasil é que se realize exame de baciloscopia de escarro de indivíduos com sintomas respiratórios, estes definidos como tosse por mais de 3 semanas. Este conjunto representa a probabilidade estatística de 4% de ser TB. Pacientes em tratamento da TB devem, mensalmente, repetir exames bacteriológicos, sendo indispensável a baciloscopia no segundo, quarto e sexto mês de tratamento (SANTOS, 2007; BRASIL, 2002; DIRETRIZES..., 2004).

Culturas e baciloscopias obtidas de pacientes com tuberculose pulmonar podem apresentar resultados positivos num dia e negativo no dia seguinte. Por isso o Ministério da Saúde recomenda que uma amostra deverá ser coletada quando da consulta na Unidade de Saúde e outra no dia seguinte em jejum pela manhã. Através de estudos laboratoriais sabemos que a segunda amostra, apresenta um acréscimo de 12,3% de rendimento pela baciloscopia corada por Ziehl-Neelsen em relação à primeira amostra (DIRETRIZES..., 2004).

Considerando as limitações para a realização do exame baciloscópico adequado, os resultados do presente estudo avaliou a qualidade da amostra clínica e os resultados dos exames de baciloscopia do material clínico *in natura* e concentrado e as culturas pela metodologia convencional e automatizada.

O cultivo convencional do material clínico para isolamento de microrganismos do complexo *M. tuberculosis* em meio de Lowenstein Jensen e pelo método automatizado, foi de 34,7% de positividade em L-J e 37,1% de positividade no método automatizado, em estudo de Almeida et al. em 2005. Desta maneira a metodologia automatizada foi considerada viável em centro de referência terciário. A metodologia é simples, mas requerer estruturação diferenciada de laboratório incluindo-se o treinamento técnico. Almeida, et al., 2005, constataram uma considerável redução no tempo de detecção do *M. tuberculosis*, pelo sistema automatizado, médias de 10,5 dias, menos de um terço do LJ média de 34,7 dias. Esta redução se deve principalmente ao uso de meio líquido, meio mais rico em nutrientes que proporciona mais condições de crescimento para as micobactérias, adicionado a isto o monitoramento da atividade metabólica no sistema automatizado que indica a positividade.

O Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde para Tuberculose (BRASIL, 2002) recomenda que tais procedimentos de realização de culturas incluam as cabines de segurança biológica, de padrão mínimo Classe II. Além disto, utilizam mais insumos que a baciloscopia sendo, portanto mais onerosas.

O presente estudo foi desenvolvido em centro governamental especializado no tratamento da tuberculose, no qual o paciente deve ter orientação diferenciada para obter a amostra clínica adequada. Mesmo assim, muitas amostras de saliva/muco foram obtidas para este estudo. De fato grande parte deste material correspondeu a indivíduos com limitações de obter o escarro. Entretanto, 22 das 83 (Anexo A) pacientes que entregaram amostras com características de saliva/muco apresentaram também outras amostras com características de escarro, reforçando a importância da coleta de mais de uma amostra (recomendação do Ministério da Saúde), no caso de diagnóstico baciloscópico (BRASIL, 2005; DIRETRIZES..., 2004; GUYTON; HALL, 1997).

As estatísticas do Serviço de Vigilância Epidemiológica do Instituto Clemente Ferreira (Informação Verbal – Nota¹) informou que das 384 notificações de tuberculose pulmonar realizada em 2007, 229 (60%) confirmaram por baciloscopia positiva e 155 (40%) notificações foram baseadas pelas informações clínico-radiológicas sem confirmação baciloscópica. Apesar do exame baciloscópico de sedimento de escarro ser rotineiras no ICF, muitas notificações não foram confirmados por este procedimento pela ausência de amostras clínicas ou pelo recebimento de materiais inadequados. No ano de 2006, foram 422 notificações sendo que 268 (64%) delas foram com confirmação baciloscópica, e 154 (36%) sem esta confirmação. Destas 43 (10%), posteriormente apresentaram culturas positivas e 42 (27%) não tiveram confirmação bacteriológica por não ter sido entregue amostras.

Os pacientes não conseguem obter boa amostra por diversos motivos. A desnutrição protéico-calórica e a desidratação reduzem a força muscular, impedindo tosse mais eficiente. Pacientes após o terceiro ou quarto mês de tratamento não apresentam mais tosse. Por questões culturais e mesmos históricos, as mulheres têm mais dificuldade de “escarrar” do que os homens.

No tempo do “fraque e do espartilho”, a humanidade “expectorava” mais, era a época das escarradeiras presença obrigatória nas salas da *Belle Époque*. O hábito não era praticado por mulheres (ANTUNES et al., 2000) .

Mesmo em situações de orientação adequada, Campinas, em 1999, relatou que 33,3% de um total de 93,6% pacientes que foram adequadamente orientados, e não conseguiram coletar uma boa amostra de escarro (CVE, 2002). A capacidade da falta compreensão das

orientações contribuiu no diagnóstico incorreto da TB. O serviço de saúde público ainda pode não estar preparado ou devidamente comprometido com a boa orientação dos pacientes para a coleta de escarro adequada. As Unidades de Saúde Pública devem ser conscientizadas e incentivadas, para que o material entregue ao laboratório atenda as necessidades para o diagnóstico correto (CVE, 2002).

Para a visualização do microrganismo na baciloscopia, é necessário pelo menos de 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de escarro. Para o cultivo, o isolamento pode ser obtido entre 10 a 100 células por ml de amostra, quando da utilização da metodologia convencional em meio de cultura de Lowenstein Jensen.

Das 07 amostras de saliva/muco, 01 (1,2%) apresentou e baciloscopia positiva para BAAR nas lâminas com o escarro *in natura*, e 03 amostras (3,6%) evidenciaram BAAR no material tratado e concentrado. Estatisticamente o “p” dos resultados foi igual a 0.5 (McNemar Test) não sendo significativo devido a pequena quantidade amostras positivas. Destas 7 um total de 6 eram casos de diagnóstico inicial e 1 era controle de tratamento, (Tabela 3). Nos casos dos diagnósticos de TB dois dos pacientes, o de número 2 e 4 (Tabela 3) apresentaram positividade no material concentrado e nas culturas, comprovando sua importância no diagnóstico da TB. Estes pacientes o de número 2 e 4 (Tabela 3) entregaram também outras amostras caracterizadas como escarro no período do estudo, e as lâminas de esfregaço destas amostras foram negativas, sugerindo a maior sensibilidade das lâminas de sedimento mesmo para amostras de escarro.

Indivíduos que respondem ao tratamento, no controle bacilosκόpio usualmente não evidenciam o bacilo no material clínico. Por outro lado vale mencionar que existem indivíduos bacilíferos com baciloscopia negativa, devido principalmente à inadequação da amostra entregue ao laboratório, pois foram resistentes ao tratamento.

A estratégia “STOP TB” da OMS, menciona a detecção de casos por meio de “bacteriologia de qualidade” (WHO, 2006). Questiona-se, portanto a eficácia dos tratamentos associadas ao exame bacilosκόpio.

Palhares et al. (1996) no Centro de Referência e treinamento DST/AIDS, utilizaram a baciloscopia na observação de 548 materiais clínicos tratados e concentrados obtidos de pacientes sintomáticos respiratórios portadores de HIV/AIDS e observaram 55% de sensibilidade para o método de baciloscopia após centrifugação e 30% de sensibilidade para a baciloscopia do material *in natura*. Em outro estudo, 300 amostras concentradas ou não foram analisadas e houve positividade de 26 (8,67%) amostras observadas *in natura* e 35 (11,6%)

amostras concentradas apontando diferença estatisticamente significativa ($X^2=1,48; p>0,05$), (CEDEÑO et al., 2004).

No presente estudo as amostras caracterizadas como escarro 34 (11,7%) foram positivas na baciloscopia do material *in natura* e 45 (15,5%) foram positivas no material concentrado, este, apresentando portanto maior índice de positividade e estatisticamente significativo com “p” igual a 0.001 (McNemar Test).

A utilização de material concentrado para o diagnóstico baciloscópico da TB não é de uso rotineiro. O programa de controle da TB DOTS sugere que ao término do tratamento (6 meses) seja coletada uma amostra de material, que usualmente não possui condições para o diagnóstico baciloscópico correto. Após seis meses de tratamento, o paciente usualmente não produz mais escarro. Considerando a eficácia da baciloscopia do material concentrado e a exigência do exame após o tratamento, esta simples conduta, deve ser adotada no país para aprimorar o controle da TB no Brasil.(BRASIL, 2002).

Todas as amostras de salivas/muco (07 amostras, 8,4%) apresentaram resultado positivo na Cultura em meio de Milddebrok 7H9 no sistema automatizado-MA e 05 (6%) no meio de cultura de Lowenstein Jensen pelo método convencional. De fato outros estudos comprovam a eficácia do caldo Milddebrok 7H9 utilizado nos sistemas automatizados que apresenta resposta mais eficaz em caso de amostras paucibacilares (ALMEIDA et al., 2006).

O diagnóstico inicial de TB no paciente 3 que apresentou 02 amostras, sendo uma de saliva/muco e a outra de escarro evidenciou cultura positiva apenas pelo MA da saliva/muco.

Os pacientes 6 e 7 que eram para diagnóstico inicial, apresentaram positividade nas culturas em L-J e no método automatizado. As respectivas baciloscopias foram negativas, ressaltando a maior sensibilidade da cultura. O Paciente 6 além da amostra de saliva/muco, apresentou no período do estudo, outra amostra caracterizada como escarro, que também apresentou positividade somente nas culturas.

Ressaltando a importância de melhorar as metodologias para diagnóstico, pois o paciente 7 só apresentou no período uma amostra de saliva que foi diagnosticada bacteriologicamente como caso de TB por ela nas culturas realizadas (Tabela 3).

Das 291 amostras com característica de escarro 67(23%) apresentaram positividade em exames de cultura. Destas 67 positivas, 56 (19,2%) apresentaram positividade em LJ e todas 67 (23%) em MA, sendo que 235 amostras (80,8%) apresentaram resultado negativo em Lowenstein Jensen e 224 amostras (77%) no MA.

As 67 (23%) amostras de escarro positivas em alguns dos métodos diagnósticos de cultura, 56 (19,2%) apresentou positividade no meio de Lowenstein Jensen e todas as

amostras (67-23%) nos cultivos em meio de Miltdebrok 7H9 no MA, (Tabela 2). O sistema automatizado também foi mais eficaz na detecção de MTB nas amostras de muco/saliva, pois todas as 7 (8,4 %) as amostras de saliva que apresentaram positividade foram positivas no MA (Tabela 2).

As etapas básicas do método de diagnóstico microbiológico: coleta de material, exame bacterioscópico, cultura, isolamento, identificação e eventual inoculação experimental para comprovar os postulados de Koch são classicamente dependentes na sequência mencionada. Desta maneira o diagnóstico microbiológico correto mesmo em laboratório especializado torna-se inútil se a amostra clínica for inadequada. Na sequência o exame bacterioscópico para alguns diagnósticos como na tuberculose, a qualidade da amostra clínica pode prejudicar o protocolo diagnóstico estabelecido. O cultivo de micobactérias também depende da amostra clínica que propicia seu isolamento e sua identificação. Em se tratando do atendimento da população em Centro de Referência Ambulatorial para Tuberculose, as dificuldades no diagnóstico correto da TB somam-se por razões diversas e os custos contribuem na escolha da metodologia. Neste contexto a análise de amostras clínicas inadequadas obtidas pela limitação inerente à doença, do indivíduo com TB em tratamento ou não, devem ser consideradas no atendimento das diretrizes nacionais no controle desta doença. Assim as amostras de saliva, mesmo que inadequadas dever ser incluídas na rotina e como o escarro, devem ser fluidificadas e concentradas para o diagnóstico pela baciloscopia e submetidas ao cultivo. O sucesso do cultivo é favorecido pela metodologia automatizada que requer pequeno investimento tendo em vista a melhoria nos resultados de diagnóstico mais precisos.

6 CONCLUSÕES

1 – Amostras de saliva/muco coradas pelo método de Ziehl-Neelsen evidenciam com menos frequência à presença de BAAR do que no escarro apesar de poucas amostras clínicas analisadas

2 – O exame baciloscópico do escarro e saliva/muco fluidificados, concentrados e corados pela Coloração de Ziehl-Neelsen evidenciaram mais freqüentemente BAAR do que em amostras clínicas não tratada.

4 – As culturas do escarro e saliva/muco evidenciaram mais resultados positivos para micobactérias pela metodologia automatizada do que pela metodologia convencional.

6 – A fluidificação e concentração de material clínico das vias áreas para baciloscopia e o cultivo utilizando metodologia automatizada no diagnóstico rotineiro da tuberculose no Brasil pode melhorar o controle da doença.

REFÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS²

ALMEIDA, E. A. et al. Rendimento da Cultura de Escarro na Comparação de um Sistema de Diagnóstico Automatizado com o meio de Lowenstein-Jensen para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar. **J. bras. Pneumol.**, v. 31, n. 3, p. 231-236, 2005.

ANTUNES J. L.; G. WALDMAM E. A.; MORAES M. A. Tuberculose através do século: ícones canônicos e signos do combate à enfermidade. **Ciên. Saud. Colet.**, v.5, n.2 p. 372-374, 2000.

BALIAN, S. C. et al. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de ver. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 12, 2002.

BENNEDSEN J. et al. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** N. 34, p. 1407-11, 1996.

BIERRENBACH A. L. et al. Incidência de tuberculose e taxa de cura, Brasil, 2000 a 2004, **Ver. Saúde Públ.**, v.41, n.1, p. 24-25, 2007.

BECKTON DICKINSON. **Manual do Usuário: BACTEC®-MGIT™960 SYSTEM**. São Paulo: Becton, 1985.

BECKTON DICKINSON. **Bula do kit para cultura no BACTEC-960®-MGIT™**, 1998. Disponível em:<[http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809501JAA\(1105\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809501JAA(1105).pdf)>>. Acesso em: 3 Out. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Helio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994. p. 21-77.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. **Tuberculose; Diagnóstico Laboratorial; Baciloscopia**. Brasília, 2001. p. 22,23,61.

²ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração**. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/elaborado pelo Comitê Técnico Científico de Assessoramento à Tuberculose e Comitê Assessor para Co-Infecção HIV-Tuberculose. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2002. p.11,12,36.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Helio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da Tuberculose: Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço**. 5 ed. Rio de Janeiro, 2002. p.34-39.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Em Saúde. Centro de Referência Prof. Helio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 3 ed. Rio de Janeiro, 2005. p.37-47.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Helio Fraga – PROJETO MSH – Tuberculose Multirresistente – **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Rio de Janeiro, p.14-20, 2007.

BROOKS G. F.; BUTEL J.S.; ORNSTON L.N.; JAWETZ E.; MELNICK J.L.; ADELBREG E. A. E. 1995. **Medical Microbiology**, USA, 20^a ed., p. 596.

CEDEÑO, R.; EUNICE, M.; ALCALÁ, B. GUEVARA, A.; ORELLAN, Y. Detección de bacilos ácidos resistentes en muestras es esputo por el método de concentración con hipoclorito de sódio. **Rev. Fac. Farm.**, v. 46, n.2, p. 8-11, 2004.

CATANZARO A, PERRY S, CLARRIDGE JE, DUNBAR S, GOODNIGHT-WHITE S, LOBUE PA, PETER C, PFYFFER G.E., SIERRA M. F. WEBER R., WOODS G., MATHEUS G., JONAS V. , SMITH K, DELLA-LATTA P. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis. Results of a multicenter prospective trial. **J. Am. Med. Assoc.**, p. 283,639-45, 2000.

CHODOSH, S. Examination of Sputum Cells. **J. Med. N. Engl.**, p. 282-854, 1970.

COELHO A. G. V. , et al., Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis* 2007. **J. Bras. Pneumol.**, v.33 n.6, p.7074-711, 2007.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. **Tuberculosis bacteriology: organization and practice**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1995, p. 806.

COSMA L. C.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria. **Rev. Microbiol.**, v.57, p.643, 2003.

CRUMP, J. A.; TANNER, D. C.; MIRRETTI, S.; MCKNIGHT, C. M.; RELLER, L. B. Controlled Comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 Systems for Detection of Mycobacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1987-1990, 2003.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA Prof. Alexandre Vranjac –**Manual de orientação para Coleta de Amostras de Escarro, e outros materiais para Baciloscopia e Cultura para diagnóstico e Controle da Tuberculose**, São Paulo, NOV, 2002, Disponível em:< ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/tb_man_or.pdf>. Acesso em: 12 Nov. 2007.

DANIEL, C. N. Tuberculosis In: TODD, et al. (Ed.). **Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica por Exames Laboratoriais**. São Paulo: Manole, 1983, v. 1, p. 793-799.

DANIEL, T.M.; BATES J. H.; DOWENS, K History of tuberculosis in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. Edited by Barry Bloom **Am. Soc. For Microbiol.**, Washington DC, p.13-14, 2005.

DELLA LATTA, P.; WEITZMAN, I. Mycobacteriology. In: Iseberg, H.D. **Essential Procedures for Clinical Microbiology**, Washington D.C. : Am. Soc. Microbiol., 1998, p. 169-203.

DIRETRIZES brasileiras para tuberculose. **J. bras. Pneumol.**, v. 30, n. 1, p. 6-12,59-62, 2004.

DONOGHUE, H. D. et al., Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. **Lancet Infect. Dis.**, v.4, p. 584-585, 2004.

FIUZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B. Transmissão e Imunopatogenia da Tuberculose. **J. bras. Pneumol.**, v.19, p.917-918, 1993.

FIUZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B. Patogenia e Imunidade. In: Veronesi, R.; Focaccia, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997, p. 917-918.

FIUZA DE MELO, F. A. et al. Tuberculose. In: LOPES A. C. **Tratado de Clínica Médica**. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2006. v. 2, p. 2623-2642.

FREIRE, D.N.; BONAMETTI, A.M.; MATSUO, T. Diagnóstico precoce e progressão da tuberculose em contatos. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.16, n.3, p. 155-156, 2007.

GREENBAUM M.; BEYT BEJ.; MURRAY P.R. The accuracy of diagnosing pulmonary tuberculosis at a teaching hospital. **Am. Rev. Respir. Dis.**, p.121:477-81, 1980.

GIAMPAGLIA, C. M. S.; MARTINS, M. C.; CHIMARA, E.; OLIVEIRA VIEIRA, G. B. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other 52rás52cación52 with p-nitrobenzoic acid using MGIT960 . **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, v. 11, p. 803, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 9ª ed., p. 442-443.

ISABERL, H. D. Clinical Microbiology, Procedures Handbook, **Amer. Society for Microbiol.**, v.1, p. 1.3.1-1.3.5, 1992.

KLESTLE D.G.; KUBICA, G.P.; Sputum collection for cultivation of 52rás52cación52: an early morning specimen our the 24 to 72 hour pool?. **Am. J. Clin. Pathol.** V. 48, p.347-351, 1967.

KOCH, R.; **Die aetiogie der Tuberculose. Berliner kinische Wochenschrift**: Organ für practische Aerzte. 1982, Chapter 15, p. 221-230.

KRITSKI A. L.; RUFINO-NETO A. Health scetor reform in Brazil: impact on tuberculosis control. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, p.4:622-26, 2000.

KRITSKI A. L. et al., Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas, **Ver. Saúd. Públ.**, n. 41, Supl.1, p. 10, 2007.

LEVY H.; FELDMAN C.; SACHO H.; MEULEN H.; KALLEBACH J.; KOORNHOF H. A. Reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Chest**, p. 95:1193-7, 1989.

MARNEILI et al., Escarro induzido, recomendações do Programa de Controle de Tuberculose do Estado do Rio de Janeiro, **J. bras. Pneumol.**, v. 30, n. 6, p. 591-592, 2004.

MENEZES E. A. et al., Incidência de Tuberculose Pulmonar Bacilífera no Município de Umirim – Ceará, no ano de 2001, **News Lab**, 74ª ed., p. 83, 2006.

MONTEIRO P. H. T. et al., Cord Formation and colony morphology for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Brasilian J. Microbiol.**, v.34, p. 1717-174, 2003.

NOLTE, F.S.; METCHOCK, B. *Mycobacterium*. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A. Tenover, R.H.P.; Tenover, F.C.; Tenover, L.B. Drug Susceptibility Testing. Manual of Clinical Microbiology. **Amer. Society Microbiol.** P. 400-437, 1995.

OMS. **Comité de experts de la OMS en tuberculosis**, Washington, D. C., 1974, 8º Publicación Científica, n.290, p.1-44.

OPAS/OMS. **Control de la tuberculosis: Manual sobre métodos y procedimientos para los programas integrados** . Washington, D. C, 1978, 2ª ed., Publicación Científica n.498, p. 10-178.

OPSLUSTIL, C. P. et al., **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo, Ed. Sarvier , 2000, p. 117.

PALHARES, M. C. A. et al., Baciloscopia após concentração com hipoclorito de sódio: um método específico e preditivo para o diagnóstico de tuberculose pulmonar em pacientes portadores de HIV/AIDS, **J. bras. Patol.**, v.32, n.3, p.98-102, 1996.

PETROFF, S. A. A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. **J. of Experimental Méd.**,v. 21, p.38-42, 1951.

RIBEIRO, S. N. et al.Tuberculose. In: BETHLEM, N. BETHLEM (Ed.). **Pneumologia** BETHLEM, N. BETHLEM, Tuberculose. In: **Pneumologia**. (ed.), 4. ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 1995, p. 379-448.

ROSEMBERG. J. **Tuberculose. Panorama global. Óbices para seu controle**. Fortaleza, Ed. Secretaria de Estado da Saúde do Ceará, 1999 p.14-22.

RUFFINO, A.N. Brasil e a Tuberculose Doença Emergente ou Reemergente? **Bol. Pneumol. Sanit.**, v. 5, p.3, 1997.

RUIZ, R. L. **Manual prático de Microbiologia Básica**, São Paulo: Edusp, 1999, p. 69-70.

SANT'ANNA, C.C.; HIJJAR, M. A., Recente Contribuição da Organização Mundial de Saúde para o controle da tuberculose na infância, **Ver. Saúde Pública**, v. 41, Supl. 1 , p. 117-120, 2007.

SANTOS J. Resposta Brasileira ao Controle da Tuberculose, **Ver. Saúde Pública**, v. 41 Supl. 1, p. 90-91, 2007.

SARMIENTO O. L.; WEIGLE K. A.; ALEXANDER J.; WEBER D. J.; MILLER W. C. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. **J clin Microbiol**, p.41:3233-40, 2003.

TSUKAMURA, M.; TSUKAMURA, S. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by p-nitobenzoic acid susceptibility. **Tubercle**, v. 45, p. 64-65, 1965.

TARANTINO, A. B. ROSEMBERG, J. Tuberculose in: **Doenças Pulmonares**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4ª ed., 1997, p.327.

TOMAN, K. **Tuberculosis detección de casos y quimioterapia. Detección de casos.** S. I; OPAS/OMS, 1980, 54 págs. 54, p. 3-72.

VIEIRA, D. E. O.; GOMES, M. Efeitos adversos no tratamento da tuberculose: experiência em serviço ambulatorial de um hospital-escola na cidade de São Paulo. **J. bras. Pneumol.**, v. 34, n. 12, p. 1049-1050, 2008.

VIANA-NIERO, C.; LEÃO, S. C. Limitações do uso do fragmento mtp40 como marcador de diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*. **J. bras. Pneumol.**, v. 30, n. 4 p. 498, 2004.

VILARIÇA, A. S.; GOMES, C.; PINA, J. Comparative analysis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. Epidemiology and predictive factors. **Rev. Port. Pneumol.**, v. 14, n. 6, p. 829-842, 2008.

WEELS, W.F.; LURIE, M.B. Experimental Airborne Disease: quantitative natural respiratory contagion of tuberculosis. **Amer. J. Hyg.**, v. 34, n.13, p. 21-40, 1941.

WHO, 2006 **A Estratégia STOP TB.**

Disponível em:< http://www.who.int/tb/publications/2006/stoptb_strategy_por.pdf> Acesso em: 06 Fev, 2008.

WOESSNER, S. **Técnicas em Citologia e Hematologia**, Barcelona: ed. Medice, 1990, p.16-32.

ANEXOS

ANEXO A - LISTAGEM DOS ESPÉCIMES PROCESSADOS E RESULTADOS

NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
1/1	113/7-2203	D	X		(-)	(-)	N	N
2/1	113/7-2217	D	X		(-)	(-)	N	N
3/2	13733-1920	C	X		(-)	(-)	N	N
4/2	13733-1946	C	X		(-)	(-)	N	N
5/3	15992-2110	D	X		(-)	(-)	N	N
6/3	15992-2147	D	X		(-)	(-)	N	N
7/4	16178-3116	D	X		(-)	(-)	N	N
8/5	17346-2985	C	X		(-)	(-)	N	N
9/6	17347-2986	C		X	(-)	(-)	N	N
10/7	20015-2161	D		X	(-)	(-)	N	N
11/8	20706-3053	C	X		(-)	(-)	N	N
12/9	21452-3049	C	X		(-)	(-)	N	N
13/10	21478-3054	C	X		(-)	(-)	N	N
14/11	21752-2329	C	X		(-)	(-)	N	N
15/12	21856-2222	C	X		(-)	(-)	N	N
16/13	21783-2975	D	X		(-)	(-)	N	N
17/13	21983-2976	D		X	(-)	(-)	N	N
18/14	22662-2340	C	X		(-)	7baar	(+)	P
19/14	22662-3177	C	X		(-)	(-)	N	N
20/15	23012-2983	C	X		(-)	(-)	N	N
21/16	25591-2972	C	X		(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
22/17	27241-3066	C	X		(-)	(-)	N	N
23/18	27575-1899	C	X		(-)	(-)	N	N
24/19	27919-3100	C	X		(-)	(-)	N	N
25/20	28761-3007	D		X	(-)	(-)	N	N
26/21	28761A-3046	D		X	(-)	(-)	N	N
27/22	29024-2988	C		X	(-)	(-)	N	N
28/23	29025-2989	C	X		(-)	(-)	N	N
29/24	29254-1923	D	X		(-)	(-)	N	N
30/25	29331-2177	D	X		(-)	(-)	N	N
31/26	29516-1945	C	X		(-)	(-)	N	N
32/27	30420-1975	C	X		(-)	(-)	N	N
33/28	30757-2318	C	X		(-)	(-)	N	N
34/28	30757-3084	C	X		(-)	(-)	N	N
35/29	31169-3086	C	X		(-)	(-)	N	N
36/30	31483-2307	C	X		(-)	(-)	N	N
37/31	32812F-2337	D	X		(-)	(-)	N	N
38/32	32993-2044	D	X		(-)	(-)	N	N
39/33	32993A-1950	D		X	(-)	(-)	N	N
40/34	33022-2082	C	X		(-)	(-)	N	N
41/35	33348-2060	D	X		(-)	(-)	N	N
42/36	33957-1951	C		X	(+)	.(+)	(+)	P
43/37	34058-2173	C	X		(++)	(+++)	(+++)	P

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
44/38	34066-2066	C	X		(-)	(-)	N	N
45/39	34070-3006	D	X		4baar	(+)	(++)	P
46/40	34092E-1939	D	X		(-)	(-)	N	N
47/41	34182-1980	C	X		(+++)	(+++)	(++)	P
48/42	34572-1878	C	X		(-)	(-)	N	N
49/42	34572-1883	C	X		(+)	(+)	N	P
50/43	34594-2168	D	X		(-)	(-)	N	N
51/43	34594-2170	D	X		(-)	(-)	N	N
52/44	34697-2275	D	X		(+++)	(+++)	(++)	P
53/45	34697C-2133	D	X		(-)	(-)	N	N
54/46	34777-1956	C	X		(-)	(-)	N	N
55/47	35001-2098	C	X		(-)	3baar	(+)	P
56/48	35100-2269	C	X		(+)	(++)	(+++)	P
57/48	35100-2270	C	X		(++)	(++)	(+++)	P
58/49	35206-2101	C	X		(-)	(-)	N	N
59/50	35322-3087	D		X	(-)	(-)	N	N
60/51	35464-2136	C	X		(-)	(-)	N	N
61/52	35489-2231	C	X		(-)	(-)	N	N
62/52	35489-3050	C	X		(-)	(-)	N	N
63/53	35602-2092	C		X	(-)	(-)	N	N
64/53	35602-3107	C	X		(-)	(-)	N	N
65/54	35663-1943	C	X		(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
66/55	35934-2180	C	X		(-)	(-)	N	N
67/56	36001-2035	C	X		(-)	(-)	N	N
68/57	36022-2281	C	X		(-)	(-)	N	N
69/58	36045-2045	C	X		(-)	(-)	N	P
70/59	36076-1982	D	X		(-)	(-)	N	N
71/60	36131-1990	C	X		(-)	(-)	N	N
72/60	36131-3172	C	X		(-)	(-)	N	N
73/61	36136-2315	C		X	(-)	(-)	N	N
74/62	36295-3065	D	X		(-)	(-)	N	N
75/63	36313-2141	D	X		(-)	(-)	N	P
76/63	36313-2157	D	X		(-)	(-)	N	N
77/64	36326-2072	C	X		(-)	(-)	(+)	P
78/64	36326-2973	C	X		(-)	(+)	(+)	P
79/65	36339-2046	C	X		(-)	(-)	N	N
80/66	36350-2107	C	X		(-)	(-)	N	N
81/66	36350-2159	C	X		(-)	(-)	N	N
82/67	36423-1993	C	X		(-)	(-)	N	N
83/68	36439-2154	C	X		(-)	(-)	N	N
84/69	36530-1859	C	X		(-)	(-)	N	N
85/70	36595-2006	C	X		(+++)	(+++)	10col.	P
86/70	36595-3121	C	X		7baar	6baar	(+)	P
87/71	36611-2224	C		X	(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
88/72	36870-3012	D	X		(-)	(-)	N	P
89/73	36871-3013	D	X		(-)	(-)	10col.	P
90/74	36876-2007	C	X		(-)	(-)	N	N
91/74	36876-2009	C	X		(-)	(-)	N	N
92/75	36922C-3175	D	X		(+)	(++)	(+)	P
93/75	36922C-3176	D	X		(+++)	(+++)	(+)	P
94/76	37066-2070	C	X		(-)	(-)	N	N
95/77	37144-2065	C	X		(+)	(+)	(++)	P
96/77	37144-2966	C	X		(-)	(-)	(+)	P
97/78	37205-2030	C	X		(-)	(-)	N	N
98/79	37288-2970	C	X		(-)	(-)	N	N
99/80	37297-3096	D	X		(-)	(-)	N	N
100/80	37297-3105	D	X		(-)	(-)	N	N
101/81	37490-2328	C	X		(-)	(-)	N	N
102/82	37541-3115	D	X		(-)	(-)	N	N
103/83	37785-2151	C	X		(-)	(-)	N	N
104/83	37785-2163	D		X	(-)	(-)	N	N
105/84	37826-2327	C	X		(-)	(-)	N	N
106/85	38006-1857	C	X		(-)	(-)	N	N
107/86	38299-1981	C	X		(++)	(++)	(++)	P
108/86	38299-2277	C	X		(+)	(+)	(+++)	P
109/87	38427-1900	C	X		(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
110/87	38427-1984	C	X		(-)	(-)	N	N
111/88	38429-2032	C	X		(-)	(-)	N	N
112/89	38471A-2301	C	X		(++)	(++)	(+++)	P
113/90	38485-2010	C		X	(-)	(-)	N	N
114/91	38505-1932	C	X		(-)	(-)	N	N
115/91	38505-1947	C	X		(-)	(-)	N	N
116/92	38554-2276	C		X	(-)	(-)	N	N
117/93	38582-2091	C	X		(++)	(+++)	(+++)	P
118/94	38614-2257	C	X		(-)	(-)	N	N
119/95	38868-2099	C	X		(-)	(-)	N	P
120/95	38868-2963	C		X	(-)	(-)	N	N
121/96	38936-2019	C		X	(-)	(-)	N	N
122/97	38944-1905	C	X		(-)	(-)	N	N
123/97	38944-2243	C	X		(-)	(-)	N	N
124/98	38979-1860	C		X	(-)	(-)	N	N
125/99	39082-2078	C	X		(-)	(-)	N	N
126/100	39231-2075	C	X		(-)	(-)	N	N
127/101	39248-2213	C	X		(-)	(-)	N	N
128/102	39358-2094	C	X		(-)	(-)	N	N
129/103	39427-2076	C	X		(-)	(-)	N	N
130/104	39486-2100	C	X		(-)	(-)	N	N
131/105	39508-1922	C	X		(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
132/106	39525-3108	C	X		(-)	(-)	N	N
133/107	39574-2105	C	X		(-)	(-)	N	N
134/108	39596-2200	C		X	(-)	(-)	N	N
135/109	39599-1992	C	X		(-)	(-)	N	N
136/110	39631-1915	C	X		(-)	(-)	N	N
137/110	39631-3171	C	X		(-)	(-)	N	N
138/111	39683-1996	C	X		(-)	(-)	N	N
139/112	39688-3023	C		X	(-)	(-)	N	N
140/113	39704-2332	C	X		6baar	(+)	(+)	P
141/114	39741-2005	C	X		(-)	(-)	N	N
142/115	39766-1933	C	X		(-)	(-)	N	N
143/116	39819-3174	C	X		(-)	(-)	N	N
144/117	39822-1855	D	X		(-)	(-)	N	N
145/117	39822-2228	C	X		(-)	(-)	N	N
146/118	39824-2968	C	X		(-)	(-)	N	N
147/119	39853-2062	D	X		(-)	(-)	N	N
148/119	39853-3052	C	X		(-)	(-)	(+)	P
149/120	39858-2278	D		X	(-)	(-)	N	N
150/121	39881-2012	D	X		(-)	9baar	15col.	P
151/122	39890-2235	D		X	(-)	(-)	N	N
152/122	39890-3051	C	X		(-)	(-)	N	N
153/123	39902-2171	D	X		(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
154/124	39906-2068	D	X		(-)	(-)	N	N
155/125	39907-2150	D		X	(-)	(-)	N	N
156/126	39921-2274	D	X		(-)	(-)	N	N
157/127	39943-1953	D	X		(-)	(-)	N	N
158/128	39954-1958	D		X	(-)	(-)	N	N
159/128	39954-2280	D		X	(-)	(-)	N	N
160/129	39960-2109	D	X		(-)	(-)	N	N
161/130	39968-1998	D	X		(-)	(-)	N	N
162/130	39968-2104	D	X		(-)	(-)	N	N
163/131	39996-2306	C	X		(-)	(-)	N	N
164/132	40063-2162	C	X		(-)	(-)	N	N
165/132	40063-3027	C	X		(-)	(-)	N	N
166/133	40088-2212	C	X		(-)	(-)	N	N
167/134	40117-1991	D	X		(-)	(-)	N	N
168/135	40163-2084	D		X	(-)	(-)	N	N
169/136	40212-3113	C	X		(+)	(+)	7col.	P
170/136	40212-3117	C	X		(+)	(++)	(+)	P
171/137	40224-2197	D	X		(-)	(-)	N	N
172/138	40239-1912	D		X	(-)	(-)	N	N
173/139	40240-1911	D	X		(-)	(-)	N	N
174/140	40243-1898	D		X	(-)	(-)	N	N
175/141	40257-1854	D		X	(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
176/142	40261-3063	C	X		(-)	(-)	N	N
177/143	40265-2138	C	X		(-)	(-)	N	N
178/144	40300-1926	D	X		(-)	(-)	N	N
179/145	40309-1957	D		X	(-)	(-)	N	N
180/146	40335-1942	D	X		(++)	(+++)	(+)	P
181/147	40340-2302	D	X		(-)	(-)	N	N
182/148	40365-2962	C	X		(-)	(-)	N	N
183/148	40365-3008	C	X		(-)	(-)	N	N
184/149	40394-2245	C	X		(-)	(-)	N	N
185/150	40412-2169	C		X	(-)	(-)	N	N
186/151	40417-2260	C	X		(-)	(-)	N	N
187/152	40510-1906	D		X	(-)	(-)	N	N
188/153	40524-2272	D	X		(-)	(-)	N	N
189/153	40524-3061	C	X		(-)	(-)	N	N
190/154	40525-2312	C	X		(-)	(-)	N	N
191/154	40525-3057	C	X		(-)	(-)	N	N
192/155	40531-2310	D		X	(-)	(-)	N	N
193/156	40557-2239	D	X		(-)	(-)	N	N
194/156	40557-2240	D	X		(-)	(-)	N	N
195/157	40603-2002	D		X	(-)	(-)	N	N
196/158	40616-1959	D		X	(-)	(-)	N	N
197/159	40622-1976	D	X		2baar	8baar	(+)	P

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
198/160	40639-1927	D	X		(-)	(-)	N	N
199/161	40643-2089	D	X		(-)	(-)	N	N
200/161	40643-2261	D		X	(-)	(-)	N	N
201/162	40648-1940	D		X	(-)	(-)	N	N
202/162	40648-2236	D	X		(-)	(-)	N	N
203/163	40674-2090	D	X		(-)	(-)	N	N
204/163	40674-3085	D	X		(-)	(-)	N	N
205/164	40684-2229	D	X		(+)	(++)	(+++)	P
206/164	40684-2241	D		X	(-)	5baar	(++)	P
207/165	40699-2129	D	X		(-)	(-)	N	N
208/166	40702-2172	D	X		(+)	(++)	(+)	P
209/167	40727-2095	D	X		(-)	(-)	N	N
210/168	40730-2069	D	X		(-)	(-)	N	N
211/69	40732-2223	D		X	(-)	(-)	N	N
212/170	40736-1924	D		X	(-)	(-)	N	N
213/170	40736-2206	D		X	(-)	(-)	N	N
214/171	40759-2253	D	X		(-)	(-)	N	N
215/172	40802-2134	D	X		(-)	(-)	N	N
216/173	40836-2221	D	X		(-)	(-)	N	N
217/173	40836-2242	D	X		(-)	(-)	N	N
218/174	40881-2311	D	X		(-)	(-)	N	N
219/175	40891-3118	C		X	(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
220/176	40935-2047	D	X		(-)	(-)	(+)	P
221/176	40935-2974	D	X		(-)	(-)	N	N
222/177	40939-2268	D		X	(-)	(-)	N	N
223/178	40942-3067	C	X		(-)	(-)	N	N
224/179	40943-1916	D		X	(-)	(-)	N	N
225/179	40943-2038	D	X		(-)	(-)	N	N
226/180	41000-1902	D	X		(-)	(-)	N	N
227/180	41000-3059	C	X		(-)	(-)	N	N
228/181	41024-2158	C	X		(-)	(-)	N	N
229/181	41024-3095	C		X	(-)	(-)	N	N
230/182	41046A- 2179	D	X		(-)	(-)	N	N
231/183	41071-1954	D	X		(-)	(-)	N	N
232/183	41071-1955	D	X		(-)	(-)	N	N
233/184	41077-2178	C		X	(-)	(-)	N	N
234/184	41077-3098	C	X		(-)	(-)	N	N
235/185	41078-2230	C		X	(-)	(-)	N	N
236/186	41095-2246	C	X		(-)	(-)	N	N
237/186	41095-2256	C	X		(-)	(-)	N	N
238/187	41111-1852	D		X	(-)	(-)	N	P
239/187	41111-1919	D	X		(-)	(+)	(+)	P
240/188	41127-3097	C	X		(-)	(-)	N	N
241/189	41133-1925	C	X		(-)	(-)	N	P

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
242/189	41133-2971	C		X	(-)	(-)	N	N
243/190	41168-1973	D	X		(-)	(-)	N	N
244/191	41185-3170	D	X		(-)	(-)	N	N
245/192	41211-3004	D	X		(-)	(-)	N	N
246/193	41225-3017	D	X		(-)	(-)	5col.	P
247/194	41239-1971	D	X		(-)	(-)	N	N
248/194	41239-1972	D	X		(-)	(-)	N	N
249/195	41240-3178	D	X		(-)	(-)	N	N
250/196	41263-1858	D		X	(-)	(-)	N	N
251/196	41263-1884	D	X		(-)	(-)	N	N
252/197	41265-2029	C	X		(-)	5baar	N	P
253/198	41266-2304	C	X		(-)	(-)	N	N
254/199	41270-1903	D	X		(-)	(-)	N	N
255/199	41270-1904	D		X	(-)	(-)	N	N
256/200	41282-2028	D	X		(-)	(-)	N	N
257/201	41299-1918	D	X		(-)	(-)	N	N
258/201	41299-2279	D		X	(-)	(-)	N	N
259/202	41300-1977	D		X	(-)	(-)	N	N
260/202	41300-1994	D	X		(-)	(-)	N	N
261/203	41302-2096	D	X		(-)	(-)	N	N
262/203	41302-2097	D		X	(-)	(-)	N	N
263/204	41302A-2204	D	X		(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
264/205	41307-1935	D	X		(-)	(-)	N	N
265/205	41307-1979	D		X	(-)	(-)	N	N
266/206	41326-1949	D	X		(-)	(-)	N	N
267/206	41326-2160	D	X		(-)	(-)	N	N
268/207	41333-1938	D		X	(-)	(-)	N	N
269/207	41333-1978	D		X	(-)	(-)	N	N
270/208	41335-1948	C	X		(+)	(++)	(++)	P
271/208	41335-2198	C	X		(+)	(+)	(++)	P
272/209	41341-2059	D	X		(-)	(-)	N	N
273/209	41341-2073	D	X		(-)	(-)	N	N
274/210	41344-2004	D	X		(-)	(-)	N	N
275/210	41344-2025	D	X		(-)	(-)	N	N
276/211	41347-1968	D	X		(-)	(-)	N	N
277/212	41349-2259	D	X		(-)	(-)	N	N
278/213	41350-1970	D		X	(-)	(-)	N	N
279/214	41351-1974	D	X		(-)	(-)	N	N
280/214	41351-2011	D	X		(-)	(-)	N	N
281/215	41358-2023	D	X		(-)	(-)	N	N
282/216	41365-2036	D	X		(-)	(-)	N	N
283/217	41371-2013	D	X		(-)	(-)	N	N
284/217	41371-2022	D	X		(-)	(-)	N	N
285/218	41374-2033	D	X		(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
286/218	41374-2074	D		X	(-)	(-)	N	N
287/219	41375-2031	D	X		(++)	(+++)	(+++)	P
288/219	41375-2167	D	X		(+)	(+)	(+)	P
289/220	41385-2043	D	X		(-)	(-)	N	N
290/220	41385-2064	D		X	(-)	(-)	N	N
291/221	41390-2061	D	X		(-)	(-)	N	N
292/222	41394-2067	D	X		(+)	(+)	(+++)	P
293/223	41396-2088	D		X	(-)	(-)	N	N
294/223	41396-2108	D		X	(-)	(-)	N	N
295/224	41402-2083	D		X	(-)	3baar	(+)	P
296/224	41402-2126	D	X		(-)	(-)	3col.	P
297/225	41403-2085	D	X		(-)	(-)	N	P
298/225	41403-2127	D	X		(-)	8baar	N	P
299/226	41404-2086	D		X	(-)	(-)	N	N
300/226	41404-2124	D	X		(-)	(-)	N	N
301/227	41406-2142	D	X		(-)	(-)	N	N
302/227	41406-2143	D		X	(-)	(-)	N	N
303/228	41408-2106	D	X		(-)	6baar	N	P
304/229	41412-2111	D	X		(-)	(-)	N	N
305/229	41412-2131	D	X		(-)	(-)	N	N
306/230	41421-2148	D	X		(-)	(-)	N	N
307/230	41421-2155	D	X		(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
308/231	41423-2139	D	X		(-)	(-)	N	N
309/232	41430-3089	D	X		(-)	(-)	N	N
310/233	41433-2201	D		X	(-)	(-)	N	N
311/234	41442-2199	D		X	(-)	(-)	N	N
312/234	41442-2216	D	X		(-)	(-)	N	N
313/235	41444-2196	D		X	(-)	(-)	N	N
314/236	41445-2232	D	X		(-)	(-)	N	N
315/237	41472-2237	D		X	(-)	(-)	N	N
316/238	41473-2271	D	X		(-)	(-)	11col.	P
317/238	41473-2331	D		X	(-)	(-)	9col.	P
318/239	41475-2305	D	X		(+++)	(+++)	(+++)	P
319/239	41475-2330	D	X		(++)	(+++)	(+)	P
320/240	41478-2254	D	X		(-)	(-)	15col.	P
321/241	41482-2267	D	X		(-)	(-)	N	N
322/242	41485-2266	D	X		(-)	(-)	N	N
323/242	41485-2299	D	X		(-)	(-)	N	N
324/243	41486-2265	D	X		(-)	(-)	4col.	P
325/243	41486-2282	D	X		(-)	(-)	(+)	P
326/244	41490-2316	D	X		(-)	(-)	N	N
327/245	41493-2298	D		X	(-)	(-)	N	N
328/246	41495-2325	D		X	(-)	(-)	N	N
329/246	41495-2326	D		X	(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
330/247	41497-2323	D	X		9baar	(+)	(+)	P
331/247	41497-2324	D	X		(+)	(+)	(+)	P
332/248	41501-2320	D	X		(-)	8baar	(+)	P
333/248	41501-3102	D	X		(-)	(-)	N	N
334/249	41502-2319	D	X		(-)	(-)	(+)	P
335/250	41504-2333	D	X		(+++)	(+++)	(+)	P
336/251	41506-2334	D	X		(-)	(-)	N	N
337/252	41522-3047	D	X		(-)	(-)	N	N
338/253	41557-2964	D		X	(-)	(-)	N	N
339/254	41582-3058	D	X		(-)	(-)	2col.	P
340/255	41585-2981	D		X	(-)	(-)	N	N
341/256	41604-2057	D	X		(-)	(-)	N	P
342/256	41604-2058	D		X	(-)	(-)	N	P
343/257	41644-2969	D		X	(-)	(-)	(+)	P
344/258	41645-3026	D		X	(-)	(-)	N	N
345/259	41663A-3009	D	X		(-)	(-)	N	N
346/260	41721-2987	D		X	(-)	(-)	N	N
347/261	41789-3064	D	X		(-)	(-)	N	N
348/262	41804-3016	D	X		(-)	(-)	N	N
349/263	41807-2984	D	X		(-)	(-)	N	N
350/263	41807-3015	D	X		(-)	(-)	N	N
351/264	41822-2977	D	X		(+)	(+)	(+)	P

Continuação do Anexo A								
NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
352/265	41827-2978	D	X		(-)	(-)	N	N
353/265	41827-3003	D	X		(-)	(-)	N	N
354/266	41829-2980	D	X		(-)	(-)	5col.	P
355/266	41829-2982	D	X		(-)	(-)	(+)	P
356/267	41830-3011	D	X		(-)	(-)	N	N
357/268	41836-3010	D	X		(-)	(-)	N	N
358/269	41836-3060	D	X		(-)	(-)	N	N
359/270	41840-3088	D	X		(-)	(+)	8col.	P
360/271	41842-3062	D	X		(-)	(-)	N	N
361/271	41842-3099	D		X	(-)	(-)	N	N
362/272	41843-3024	D	X		(-)	(-)	N	N
363/272	41843-3025	D		X	(-)	(-)	N	N
364/273	41846-3045	D	X		(-)	(-)	N	N
365/274	41874-3104	D	X		(-)	(-)	N	N
366/274	41874-3120	D	X		(-)	(-)	N	N
367/275	41875-3101	D	X		(-)	(-)	N	N
368/275	41875-3106	D	X		(-)	(-)	N	N
369/276	41884-3173	D		X	(-)	(-)	N	N
370/277	41885-3119	D	X		(-)	(-)	N	N
371/278	41886-3112	D	X		(-)	5baar	9col.	P
372/279	41887-3110	D	X		(-)	(-)	N	N
373/280	45456-2211	D	X		(-)	(-)	N	N

Continuação do Anexo A

NL/NR	RG/LB	D/C	E	SM	ESF	SED	LJ	MA
374/281	5070/81-1853	C		X	(-)	(-)	N	N

374 amostras de 281 pacientes

NL= Numero Total de amostras; NR= Numero de Pacientes; RG. = Numero de Prontuário; LB.= Numero código do Laboratório; D= Diagnóstico; C=controle; E= escarro; SM= Saliva / muco; ESF= Lâmina de Esfregaço; SED = Lâmina de Sedimento pós-centrifugação; LJ= Meio de Lowenstein Jensen MA= Sistema BACTEC-MGIT 960® - BECTON-DICKSON., BAAR= Bacilos Álcool Acido Resistentes ; Col..= Colônias; P=positivo.

ANEXO B - PREPARO DOS REAGENTES

Todos os reagentes foram preparados segundo normas prescritas no Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 1994, 2005).

Os corantes de Gram e Leishman foram comprados prontos. O corante de Ziehl-Neelsen foi preparado no laboratório, assim como os reagentes para o método de descontaminação de Petroff.

ANEXO B.1 - MÉTODO DE PETROFF

Solução de hidróxido de sódio a 4% (solução A)

Hidróxido de sódio	4,0 g
Água destilada	100 ml

Foi dissolvido 4,0 g de hidróxido de sódio em 100 ml de água destilada. Autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Solução de ácido clorídrico 1,0 N contendo 0,004% de vermelho fenol (Solução B)

HCl concentrado a 37%	8,5 ml
Solução de vermelho de fenol a 0,4%	1,0 ml
Água destilada q.s.p	100 ml

Foi adicionado 8,5 ml de HCl a aproximadamente 80 ml de água. Adicionado 1 ml da solução de vermelho de fenol a 0,4% (solução C). Completado o volume para 100 ml com água destilada. Autoclavado 121 °C por 15 minutos.

Solução de vermelho fenol a 0,4% (solução C)

Vermelho de fenol	0,4 g
Solução de hidróxido de sódio a 1N	100 ml

Foi dissolvido 0,4g de vermelho de fenol em 100 ml de solução de NaOH a 1N e autoclavado a 121 °C por 15 minutos (BRASIL, 1994, 2005).

ANEXO B.2 - CORANTES PARA METODOLOGIA DE ZIEHL-NEELSEN

Fucsina Fenicada a 0,3%

Fucsina básica	3 g
Álcool etílico a 95 % PA	100 ml
Dissolveu a fucsina no álcool, e acrescentou: Fenol liquido	55 ml
Água Destilada quente	q.s.p. 1.000 ml

Filtrou e deixou repousar por 24 horas, foi estocado em frasco escuro.

Fenol Liquido

Fenol cristalizado	1.000 g
Água destilada	100 ml

Foi dissolvido em banho Maria e após resfriamento esta solução foi utilizada no preparo da Fucsina a 0,3 %.

Azul de Metileno A 0,1 %

Azul de metileno	1 g
Álcool etílico PA	100 ml

Descansou por 24 horas e foi filtrada e estocada em frasco escuro.

Solução Descorante

Álcool etílico PA	970 ml
Ácido Clorídrico PA	30 ml

(BRASIL, 1994, 2005)

ANEXO B.3 - MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN

Fosfato monopotássico anidro	0,4 g
Citrato de magnésio	0,1 g
Sulfato de magnésio	0,04 g
Asparagina	0,6 g
Glicerina bidestilada	2,0 ml
Ovos homogeneizados	167,0 ml
Verde malaquita a 2%	3,3 ml
Água destilada	100,0 ml

Os sais e o aminoácido foram dissolvidos em água destilada e a solução foi esterilizada por autoclavação a 120 °C por 15 minutos. Os ovos homogeneizados e a solução de Verde Malaquita (2%) estéril foram adicionados ao meio base esterilizado e frio. O meio distribuído em tubos de vidro estéril com tampa de rosca ($\pm$ 6ml por tubo) e coagulado a 80 °C por 50 minutos. Um controle de esterilidade do meio foi realizado (incubação em estufa a 37 °C). Os meios foram armazenados a temperatura ambiente.

Solução de verde malaquita 2%

Verde Malaquita	2,0 g
Água destilada “fervente”	100 ml

As 2 gramas de verde malaquita foram dissolvidas com água lentamente, em um recipiente de gral com auxílio de um pistilo, até formar um líquido espesso.

Filtrado, acrescentado o restante da água destilada fervente.

Esterilizado a 110 °C por 30 minutos ou 120 °C por 15 minutos (BRASIL,1994, 2005).

ANEXO B.4 - MEIO DE MIDDLEBROOK 7H9 DO SISTEMA AUTOMATIZADO

O meio de Middlebrook 7H9 veio pronto dentro do tubo TUBO MGIT® (Mycobacteria Growth Indicator tube). Cada tubo possui 7ml de caldo Middlebrook 7H9/ Caseína-Pepton e Glicerol, acrescidos de 0,8 ml de PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidixo, Trimetoprim e Azlocilina) e 110 µl de indicador fluorescente e enriquecido com OADC (Albumina bovina, Dextrose, Catalase e Ácido oléico). Os tubos possuem também uma atmosfera com 10% de CO₂. Esses tubos, pertencem ao sistema BBL™MGIT™ 960. (BECTON DICKINSON, 1998)

ANEXO B.5 - MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN COM PNB

Foi acrescentado ao meio básico de L-J o PNB, na concentração 500 µg/ml. Após este procedimento o meio foi distribuído em tubos de vidro estéril com tampa de rosca (±6ml por tubo) e coagulado a 80 °C por 50 minutos. Foi realizado um controle de esterilidade do meio (incubação em estufa a 37 °C). Os meios foram armazenados à temperatura ambiente (BRASIL, 1994, 2005).

ANEXO B.6 - CULTIVO EM CALDO COM PNB NO SISTEMA AUTOMATIZADO

A solução de estoque do ácido para nitrobenzoico (PNB): 25 mg/ml foi preparada:

1. Foi dissolvido 2,5 g de PNB em 15 ml de solução de 1 N de NaOH
2. Completado com água destilada estéril até 80 ml.
3. Foi acrescentado 1 ou 2 gotas de fenolftaleína à 0,1% (solução em etanol).
4. Acrescentado gota a gota (cerca de 3 ml) solução de HCL 1 N até mudança de cor.
5. Nas ocorrências de precipitação, devido ao excesso de ácido, era acrescentado mais um pouco de NaOH e completado com água destilada estéril até 100 ml
6. Alíquotas da solução estoque de PNB, foram armazenadas em criotubos, na quantidade necessária para cada lote de meio.
 1. Adicionou-se 0,8 ml de OADC em cada tubo MGIT (2 tubos para cada teste e para a cepa controle)
 2. Utilizou-se um tubo controle para cada cepa da amostra clínica e para a cepa controle HV37 rv.

3. Adicionou-se 168 µl da solução estoque PNB nos demais tubos.

Sendo: Concentração da solução estoque, PNB: 25 µg/ml e concentração final MGI PNB: 0,5 µg/ml, (BECTON DICKINSON, 1998).