ADALBERTO FARACHE FILHO

**EMPREGO DA TÉCNICA DE CULTURA SIMPLIFICADA
DE KUDOH & KUDOH (1974) PARA DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DA TUBERCULOSE PULMONAR
EM SAÚDE PÚBLICA**

Tese apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Departamento de Epidemiologia, para obtenção do título de **Doutor em Saúde Pública.**

**SÃO PAULO
1996**

ADALBERTO FARACHE FILHO

**EMPREGO DA TÉCNICA DE CULTURA SIMPLIFICADA
DE KUDOH & KUDOH (1974) PARA DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DA TUBERCULOSE PULMONAR
EM SAÚDE PÚBLICA**

Tese apresentada à Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo,
Departamento de Epidemiologia, para
obtenção do título de **Doutor em Saúde
Pública.**

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Niero

**SÃO PAULO
1996**

*Aos meus pais, esposa e filho,
dedico este trabalho.*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS

RESUMO

SUMMARY

	Pág.
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
1. Amostras.....	16
2. Meios de Cultura.....	17
3. Comparativo entre as técnicas de descontaminação de amostras descrita por Kudoh & Kudoh (semeada em meio de Ogawa-Kudoh) e a técnica de descontaminação de Petroff (semeada em meio Lowenstein-Jensen)..	19
3.1. Técnica de descontaminação - Kudoh & Kudoh.....	20
3.2. Técnica de descontaminação - Petroff.....	22
3.3. Incubação das culturas, leituras e resultados.....	24
3.4. Comparativo de custos de material de consumo, equipamentos necessários e tempo gasto para a execução das técnicas de descontaminação e cultura em estudo.....	25
3.5. Análise estatística.....	26
4. Sobrevivência do bacilo da tuberculose em temperatura ambiente, após descontaminação e semeadura pela técnica descrita por Kudoh & Kudoh.....	27
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO.....	50

CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXO 1.....	118
ANEXO 2.....	119
ANEXO 3.....	120
ANEXO 4.....	121
ANEXO 5.....	125

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Rinaldo Niero*, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela amizade irrestrita, apoio constante e orientação segura.

À *Profa. Dra. Leonor de Castro Monteiro Loffredo*, da Faculdade de Odontologia - UNESP, Araraquara, pela orientação na análise estatística.

À secretária *Aparecida Bernardete Rocateli Jesus*, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, pela colaboração incansável e precisa na digitação e revisão dos textos.

Às funcionárias *Joselma Gomes Duque* e *Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta*, do laboratório da Disciplina de Higiene Social da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, pela colaboração e apoio na elaboração dos experimentos.

À bibliotecária *Natalina Lambini Escremin*, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, pela revisão das referências bibliográficas.

Aos funcionários do Laboratório do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, pela cessão das amostras usadas nos experimentos.

Aos colegas do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, pelo apoio e incentivo a esse trabalho.

RESUMO

Comparou-se a técnica tradicional de descontaminação de amostras de escarro descrita por Petroff com inoculação em meio de Lowenstein-Jensen (LJ), com a técnica simplificada de descontaminação descrita por Kudoh & Kudoh e inoculação em meio de Ogawa modificado. Utilizaram-se 503 amostras de escarro cedidas pelo Laboratório do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, sendo 461 provenientes de pacientes para diagnóstico e 42 de pacientes submetidos a controle de tratamento. Do total de amostras, 26 foram positivas pelas duas técnicas de cultura, dez positivas pela técnica simplificada de Kudoh & Kudoh e meio de Ogawa modificado e não positivas na técnica de Petroff em meio LJ e seis não positivas na técnica simplificada e positivas na técnica tradicional, resultando 36 amostras positivas com a técnica simplificada e 32 com a técnica tradicional. Várias comparações de resultados foram feitas aplicando-se o teste de concordância de Kappa. Além dos resultados das culturas, compararam-se o custo do material de consumo utilizado, os equipamentos de laboratório necessários e o tempo gasto para cada amostra processada pelas duas técnicas. Estudou-se também a sobrevivência do Bacilo de Koch (BK) após descontaminação e semeadura da amostra pela técnica de Kudoh & Kudoh e manutenção em temperatura ambiente, simulando-se o transporte da amostra por até 120 horas antes de ser incubada em estufa. Verificou-se que a técnica de descontaminação e cultura de amostras de escarro descrita por Kudoh & Kudoh oferece vantagens em relação a técnica tradicional e concluiu-se que pode ser utilizada para diagnóstico bacteriológico de tuberculose pulmonar em Saúde Pública, auxiliando na busca de casos em áreas onde os recursos laboratoriais são escassos. Permite ainda a descontaminação e inoculação das amostras de escarro em áreas carentes e remessa das culturas para incubação e acompanhamento em laboratórios centrais.

SUMMARY

Traditional technique of decontamination sputum sample related by Petroff with inoculation in Lowenstein-Jensen medium and simplified technique decontamination described by Kudoh & Kudoh and inoculation in Ogawa modified medium were compared. A total of 503 sputum sample grant by Special Health Service of Araraquara Laboratory were used, 461 being patients from diagnosis and 42 patients submitted to treatment control; 26 samples from total were positive in both culture techniques, ten sample positive according to simplified Kudoh & Kudoh and Ogawa modified medium and non positive on Petroff technique in LJ medium and six non positive on simplified technique and positive on traditional technique, result 36 samples positive on simplified technique an 32 positive on traditional technique. Many results comparison were made using Kappa consonance test. Beyond culture results, consumption material cost, laboratory equipament necessary and time wasted in the two techniques. BK survival after decontamination and sample sowing by Kudoh & Kudoh technique and maintenance in enviroment temperature were studied too, simulating sample transport until 120 hours before incubation. Occured that techniques of decontamination of sputum sample described by Kudoh & Kudoh offered advantage comparing with traditional technique and conclude that it is possible to be used for bacteriological diagnosis of pulmonary tuberculosis in Public Health, helping on searching were laboratory conditions aren't sufficient. Also enables decontamination and sputum sample inoculation in destitute areas and remittance of cultures to incubation and accompanying in central laboratory.

INTRODUÇÃO

Em todo o mundo a tuberculose é considerada a principal causa de morte provocada por um único agente, matando cerca de três milhões de pessoas por ano^{11, 99,111,142,147}. É a infecção mais disseminada conhecida pelo homem e um terço da população mundial alberga o agente da doença; anualmente, cerca de oito milhões de pessoas desenvolvem tuberculose clínica^{20,36,61,63,85,100,108,111, 127,132,137,141,143,147}. Considerada como a maior matadora da humanidade e fora de controle em algumas partes do mundo¹³⁹, a tuberculose é responsável por um quarto das mortes preveníveis^{63,85} e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima a prevalência mundial em torno de vinte milhões de casos ativos da doença^{36,85,99}. Responsável por 7% de todas as mortes nos países em desenvolvimento¹⁰⁸, é uma doença mais social que infecciosa, associada com pobreza, má nutrição e aglomerações⁶¹.

Dentro do gênero *Mycobacterium* o agente infeccioso mais frequente encontrado no ser humano é o *Mycobacterium tuberculosis*. Suas principais manifestações clínicas incluem a tuberculose pulmonar, que é a forma mais infecciosa da doença, a meningite tuberculosa que causa maior número de mortes em crianças e a tuberculose miliar^{141,143}.

A infecção é transmitida por gotículas dispersas no ar, produzidas por indivíduos com tuberculose laringea ou pulmonar, através do espirro, da tosse ou da fala. Estes indivíduos são infectantes quando expõem um número grande de bacilos e a infecção ocorre quando indivíduos suscetíveis inalam estas gotículas; entretanto somente 5 a 15% dos indivíduos infectados desenvolverão doença ativa até dois anos após infecção primária¹²⁹.

A tuberculose não tratada tem um coeficiente de letalidade bastante elevado, em torno de 50%, reduzido significativamente pela quimioterapia

quando aplicada corretamente^{141,143}. Em 1990, nos países de baixa renda, a tuberculose foi responsável por dois milhões de mortes, dez vezes mais que as doenças tropicais consideradas e agrupadas como causa única de mortes nestes países; 3 a 4% do total de doenças no mundo foi provocado por tuberculose⁹².

A incidência e prevalência da tuberculose vinha apresentando redução sensível e rápida até o início da década de oitenta, notadamente nos países desenvolvidos, inclusive com estabilidade no quadro epidemiológico; entretanto, nos países em desenvolvimento o problema persistia pois as melhorias eram registradas mais lentamente^{105,140,142}. Nos países desenvolvidos, os resultados favoráveis até então obtidos foram consequência da maior disponibilidade de recursos humanos, técnicos e financeiros e da eficiente quimioterapia aplicada^{140,142}.

A partir desta época, a estagnação observada na tendência de redução da tuberculose nos países desenvolvidos passou a ser preocupante; verificou-se então que a interação entre o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e o bacilo da tuberculose (BK) tem contribuído para a reativação da doença em todo o mundo⁷⁴.

Nos países desenvolvidos, os recursos disponíveis contribuem para o melhor controle da tuberculose, quando comparado aos demais^{30,76,142}. Entretanto, a incidência da doença vem aumentando entre suas populações mais pobres, não só como reflexo da crise econômica que agrava o quadro de pobreza, promiscuidade e desnutrição, mas também como consequência da disseminação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), cujo número de casos vem aumentando gradativamente e favorece a instalação de infecções oportunistas, pela queda acentuada da resistência imunológica acarretada pelo VIH. A infecção por *M. tuberculosis* vem se tornando uma das infecções oportunistas mais comuns em pessoas infectadas pelo VIH^{30,76}. A

falta de educação sanitária da população sobre a doença, também contribui para sua disseminação¹⁶.

A partir de 1986, a associação entre SIDA e tuberculose foi detectada pelo Centro para Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América, que notificou um aumento dos casos de tuberculose no País devido, em grande parte, ao aumento da epidemia de SIDA. Em muitos países industrializados esta associação foi notificada e explicada pela progressão de infecção tuberculosa prévia até tuberculose ativa, ocasionada pela imunodeficiência produzida pelo VIH³⁰.

Mesmo antes da SIDA se converter em problema grave de saúde pública nos países em desenvolvimento, os programas de controle da tuberculose apresentavam resultados pouco eficazes. Nestes países, onde a prevalência da infecção tuberculosa é elevada, o aumento dos casos de SIDA eleva o número de casos de tuberculose, como consequência da reativação da infecção tuberculosa induzida pela imunodeficiência provocada pelo VIH³⁰.

A relação entre tuberculose e SIDA vem sendo bastante estudada em todo o mundo e grande número de pesquisas têm demonstrado as particularidades regionais e o impacto na epidemiologia, diagnóstico e tratamento das doenças provocado pela associação de infecções por VIH e micobactérias^{8,30,33,35,39,45,48,54,55,64,76,78,79,86,93,100,104,107,111,114,144,147}.

A interação entre VIH e *M. tuberculosis* é favorecida pela sobreposição de populações infectadas com os dois agentes patogênicos. Em cada 1.000 pessoas infectadas exclusivamente por BK, dois desenvolverão tuberculose anualmente; por outro lado, para cada 1.000 pessoas infectadas simultaneamente por *M. tuberculosis* e VIH, 80 desenvolverão tuberculose anualmente, ou seja, 40 vezes mais que nos indivíduos não infectados por VIH^{93,147}.

Em 1992, o Ministério da Saúde registrou que a tuberculose apresentava coeficiente de incidência de 57,6 casos novos por 100.000 habitantes para todas as formas e de 30,4 por 100.000 para bacilíferos. Do total, 85,6% são casos de tuberculose pulmonar e 14,4% de formas extrapulmonares. O número de casos de SIDA notificados até setembro de 1994 atingiu 55.894, disseminados em todas as classes sócio-econômicas, embora com maior frequência nas faixas onde a situação de saúde é mais comprometida por razões sociais⁶⁴.

Entre as doenças oportunistas notificadas a tuberculose ocupa o 3º lugar no Brasil, com 19,9% nos dados acumulados entre 1980 e 1993. Este valor difere dos Estados Unidos e países europeus onde a frequência de tuberculose é mais baixa e de países africanos onde é muito elevada⁶⁴.

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a infecção pelo VIH é a ocorrência mais significativa que alterou o equilíbrio homem-bacilo de Kock nos últimos 100 anos, sendo decisiva no risco de adoecimento por tuberculose, tanto por infecção exógena como reativação endógena¹¹⁴.

Associação de tuberculose com infecção por VIH talvez seja, senão a mais grave, pelo menos a mais característica em termos de morbidade, por se tratar de uma combinação de fatores epidemiológicos, sociais e individuais que favorecem o desenvolvimento de ambas as condições, não uma simples interação patológica⁶⁴.

A tuberculose tem afetado o prognóstico e a qualidade de vida das pessoas infectadas pelo VIH. O controle da tuberculose é possível sob o aspecto técnico e econômico; entretanto, as medidas de controle disponíveis adquirem características singulares quando se trata de pacientes infectados por VIH³⁵.

O controle efetivo da tuberculose é alcançado com a quebra de cadeia de transmissão da doença, através da descoberta precoce das fontes de infecção para que a aplicação imediata da quimioterapia as torne não infectantes^{81,113}.

A transmissão da tuberculose é feita a partir dos portadores, indivíduos em cujo escarro existe o bacilo^{81,113}. Esses chamados bacilíferos, abrigam a forma mais grave da doença e representam grande risco para seus comunicantes e para a comunidade. São considerados como as fontes de infecção mais importantes na transmissão da tuberculose pois as pessoas por eles infectadas adoecem com maior frequência que as infectadas por pacientes não bacilíferos¹¹³. Os pacientes com positividade ao exame microscópico para tuberculose, infectam um número maior de contatos que outros pacientes, em média 60% contra 20% de infecção nos contatos de casos apenas positivos à cultura^{62,116}. Cada caso bacilífero sem tratamento pode infectar, em média, de 5 a 10 pessoas¹¹⁶ até 14 a 16 pessoas por ano¹⁴⁶.

O desconhecimento das características da tuberculose e seu poder de contágio faz com que a ignorância e falta de educação sanitária sejam fatores relacionados com a maior frequência da infecção tuberculosa. A cobertura escassa dos serviços de saúde e a ineficiência dos programas de controle faz com que a prevalência de casos contagiosos, não tratados ou tratados ineficazmente, seja alta e represente risco para os contatos e para a população em geral¹⁴⁶.

O risco de adoecer por tuberculose depende, entre outros fatores, da competência imune do indivíduo; outros podem diminuir esta imunidade como desnutrição, alcoolismo, uso de drogas e patologias associadas como diabetes, silicose e doenças cujo tratamento requer o uso de medicação imunomoduladora^{85,146}. A infecção por VIH provoca imunodeficiência e constitui o mais poderoso fator de risco para provocar a enfermidade tuberculosa¹⁴⁶.

A OMS estima 1,7 bilhão de pessoas com infecção tuberculosa, com o surgimento anual de oito milhões de casos novos e 2,9 a 3,3 milhões de mortes;

isto permite a projeção de 80 milhões de casos novos e cerca de 30 milhões de mortes por tuberculose na década de 90, em todo o mundo^{9,63,86,99,111,147}. Diante deste quadro a OMS formulou um programa de controle da tuberculose tendo como modelo os programas desenvolvidos pela União Internacional contra a Tuberculose e Enfermidades Respiratórias (UICTER), com o objetivo de detectar 70% dos casos e realizar uma taxa de cura de 85%, rompendo a cadeia de transmissão e melhorando o quadro epidemiológico em diferentes países⁹.

A meta proposta pela OMS de eliminar a tuberculose nos países industrializados deve ser adiada por alguns quinquênios devido ao impacto da epidemia de SIDA, mais grave nos países em desenvolvimento, nos grupos minoritários e nos socialmente desprotegidos dos países desenvolvidos³⁵.

Entre a população com infecção apenas pelo bacilo da tuberculose o risco anual de desenvolver uma tuberculose clínica está entre 0,2 e 0,8%, bem menor que entre indivíduos infectados simultaneamente com VIH e BK cujo risco anual de desenvolver a doença atinge 5,6 a 7,9%⁹.

PIO & WESTERN¹⁰⁶ (1976) avaliaram que a tuberculose ainda permanecia como problema no Continente Americano e apesar dos avanços conseguidos nos métodos de controle, atribuíam o fracasso ao fato da não aplicação destes métodos para toda a população. Para os autores a integração dos serviços de saúde prometiam resultados mais favoráveis na região.

Na América Latina e Caribe a tuberculose endêmica varia muito de um país para outro, dependendo do desenvolvimento sócio-econômico, da estabilidade política, do desenvolvimento dos serviços de saúde em geral e do programa de controle da tuberculose em particular e da educação sanitária da população. Outros fatores desfavoráveis são: desproporção entre necessidades sanitárias e recursos disponíveis; distribuição e utilização irregular destes recursos; crescimento da população e hábitos migratórios; cobertura limitada e

má utilização das instalações de atenção sanitária; deficiências dos programas de controle da tuberculose e, ultimamente, as consequências da propagação da infecção por VIH^{130,147,149,150}.

Segundo CLANCY e cols.¹⁹ (1991) considera-se um país com baixa incidência quando o número de casos de todas as formas ativas de tuberculose está abaixo de 10 por 100.000 habitantes e grupos de alto risco quando a incidência é igual ou maior que 100 por 100.000 habitantes.

A incidência estimada de casos de tuberculose pulmonar confirmados por baciloscopia é de 75 a 130 por 100.000 habitantes nos países de situação endêmica extremamente grave e de 5 a 30 naqueles de gravidade leve e moderada. No Brasil a situação é considerada grave como em outros países da América Latina, embora diferenciada da maioria. As taxas de incidência em nosso país são moderadas e mostram uma tendência descendente lenta, apesar da possibilidade de omissão de uma proporção importante de casos¹⁴⁷.

No início dos anos oitenta o coeficiente de incidência anual de tuberculose nos países desenvolvidos estava próximo ou abaixo de 10 por 100.000 habitantes; para alguns países em desenvolvimento estes coeficientes atingiam valores 20 a 30 vezes maiores, alcançando até 300 casos por 100.000 habitantes⁴².

Para a OMS a tuberculose apresenta situações diferenciadas em cada região: na região africana a estimativa é de 1,4 milhão de novos casos por ano, cerca de 270 casos por 100.000 habitantes; a Ásia sul-oriental é responsável por 25% dos casos de tuberculose de todo o mundo, com taxas de notificação variando entre 35,4 a 400 por 100.000 habitantes; na região do Mediterrâneo Oriental a estimativa é de 600.000 casos por ano e existe também grande variação nas taxas de notificação de casos; para a região do Pacífico Ocidental, as taxas de incidência de casos com baciloscopia positiva variam entre 10 a 220

por 100.000 habitantes. A subnotificação de casos contribui para a variabilidade das taxas e para uma redução sensível da confiabilidade dos dados em alguns países¹⁴⁵.

Na região das Américas o problema da tuberculose também apresenta magnitude variável. Canadá e Estados Unidos apresentam coeficientes de morbidade baixos, apesar de recentes aumentos atribuídos aos casos de tuberculose em pessoas infectadas pelo VIH. Sem considerar a subnotificação de casos em muitos países da região, os casos notificados variam entre 50 e 150 por 100.000 habitantes¹⁴⁵.

No Brasil, as ocorrências de casos de tuberculose registrados pelo Ministério da Saúde^{12,13,14,15,50,51,52} no período de 1980 até 1994, estão distribuídos ano a ano no Gráfico 1. Observa-se que dentre os quinze anos citados onze apresentaram incidência superior a 80.000 casos e apenas nos anos de 1980 e 1993 o número de casos novos foi inferior a 70.000. Percebe-se que as variações registradas não são grandes e demonstram certa estabilização nas ocorrências com uniformidade inclusive nas proporções de casos de tuberculose pulmonar e de bacilíferos (Gráfico 1).

Em países como México⁴⁰, Chile¹⁴⁴, Haiti⁴⁸, Paraguai⁵⁴, Argentina⁵⁵, Cuba¹⁰⁰ e até Estados Unidos^{85,112,129}, a tuberculose constitui problema de Saúde Pública, em maior ou menor grau, com algumas variações nas características epidemiológicas. No Brasil¹³⁰, a tuberculose ainda é considerada um problema grave de saúde pública.

GRÁFICO 1 - Distribuição de casos de tuberculose (Total, pulmonar e bacilíferos) notificados entre 1980 e 1994. Brasil

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL ^{12, 13, 14, 15, 50, 51, 52}

Não resta dúvida que a tuberculose é um problema sócio-econômico grave e crescente em todo o mundo e, apesar da subnotificação que ocorre principalmente nos países em desenvolvimento, o número de casos e os coeficientes de incidência registrados demonstram que muito ainda precisa ser feito para que se alcance um controle efetivo da doença, pelo menos com a redução destes números a valores compatíveis com os países onde é considerada de menor gravidade.

Além da co-infecção VIH-TB e do risco de adoecer por tuberculose, outro aspecto importante a ser discutido em relação a doença é a multiresistência à drogas que vem contribuindo bastante para agravar o seu quadro epidemiológico em todo o mundo³⁰.

Os casos de tuberculose resistentes a uma ou mais das drogas primárias usadas no tratamento, aumentam significativamente os custos dos programas com tratamento pelo aumento de sua duração, além de reduzirem a eficácia da terapia e aumentar a prevalência da doença^{46,99}.

A resistência à drogas tem sido estudada observando-se tendência de elevação em alguns países como Argentina⁵, Estados Unidos^{33,35,61,76}, México³⁵ e Paraguai⁵⁴, entre outros.

No Brasil, os dados sobre resistência inicial ou adquirida do *M. tuberculosis* às drogas estão atualizados até o final da década de 1980, com grandes variações regionais e locais, refletindo basicamente problemas operacionais como abandono do tratamento e uso irregular das drogas nos programas de controle^{64,124}. Recentemente PINTO e cols.¹⁰⁴ (1996) estudaram a resistência a drogas em pacientes com SIDA em um centro de referência em São Paulo e encontraram 20,6% resistentes a uma ou mais drogas, sendo 10,9% considerados como resistência adquirida por terem recebido tratamento prévio para tuberculose.

Epidemiologicamente, considera-se caso de tuberculose pulmonar apenas aqueles nos quais a doença tem confirmação bacteriológica, segundo recomendações da OMS^{87,97} e OPAS⁹⁵.

Nos últimos anos vários estudos foram realizados em todo o mundo avaliando técnicas novas para o diagnóstico rápido de tuberculose, incluindo métodos radiométricos^{44,49,122,123,126,138}, amplificação de ácidos nucleicos por reação da polimerase em cadeia (PCR)^{23,60,91,103,111} e métodos sorológicos como enzimaímunoensaio^{22,58,59,73,111}. Entretanto, técnicas como PCR, apesar de promissoras, não eram recomendadas como rotina^{17,111}.

Outras técnicas de diagnóstico como raio X e prova tuberculínica também têm sido usadas e associadas aos métodos bacteriológicos na tentativa de melhorar a busca de casos de tuberculose pulmonar e a quebra da cadeia de transmissão com redução da incidência e prevalência da doença^{4,5,6,21,43,111,115}.

O isolamento e identificação do agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis*, é fundamental para o diagnóstico definitivo da tuberculose. Por outro lado, é importante a determinação da sua suscetibilidade à drogas e fundamental para que a cadeia da transmissão da doença seja interrompida através do tratamento adequado do paciente para reduzir a disseminação da doença^{115,119,129,130}. O laboratório tem papel importante neste processo^{128,129}.

É importante a seleção de sintomáticos respiratórios para racionalizar a utilização do exame bacteriológico, com prioridade para aqueles com sintomas há mais de duas semanas, embora não deva ser considerado em termos práticos e operacionais⁶. O paciente também deve ser orientado para colher uma amostra de boa qualidade^{56,81}, importante para o exame bacteriológico.

Os programas de controle da tuberculose (PCT) se apoiam em um conjunto de atividades com o objetivo de erradicar a tuberculose da sociedade, quebrando a cadeia de transmissão da infecção, o que pode ser alcançado através da identificação e tratamento efetivo dos casos infecciosos^{5,128}. As atividades dos programas tem como base o diagnóstico, o tratamento eficaz com medicamentos e a imunização com BCG⁸¹.

Para os PCT a técnica bacteriológica prioritária é o exame de esfregaço corado (baciloscopia)^{128,130} seguido da cultura e provas de sensibilidade; os dois primeiros são as técnicas de diagnóstico mais usadas na rotina dos laboratórios de Saúde Pública^{2, 4,19,56,82,83,90,117,128}. A evolução do paciente também é acompanhada por exames bacteriológicos²⁶.

Apesar de rápida e fácil, a baciloscopia necessita de maior quantidade de bacilos que a cultura para que o resultado seja positivo^{26,58,60,70,128}. Enquanto para a baciloscopia ser positiva são necessários mais de 5.000 Bk por mL de amostra, 10% deste número é suficiente para que haja crescimento²⁶ e apenas 10 bacilos são necessários para o desenvolvimento de uma colônia no cultivo^{58,70}.

Nas culturas positivas as colônias de *M. tuberculosis* são de cor creme, rugosas, com aspecto de couve-flor e se desenvolvem na superfície do meio; *M. bovis* e algumas colônias de *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida são mais planas e de superfície lisa. Quando o meio está muito úmido, as colônias de qualquer espécie de micobactéria aparecem lisas⁹⁴.

A cultura apresenta sensibilidade maior que a baciloscopia e sua utilidade para o diagnóstico de casos de tuberculose paucibacilares é marcante, embora sua complexidade técnica, demora nos resultados e custos sejam mais elevados que a baciloscopia^{26,58,60,70,89,90,103,118,125,128,131}. A cultura também apresenta importância fundamental para os programas de controle da tuberculose pois os testes de suscetibilidade às drogas são necessários para determinação da resistência do *M. tuberculosis* aos medicamentos usados nos esquemas de tratamento¹²⁸.

Nos países desenvolvidos onde a situação epidemiológica é diferente, a cultura terá um rendimento maior; entretanto, nestes países a primeira etapa também deve ser o diagnóstico de indivíduos com escarro positivo à

microscopia dentre os sintomáticos respiratórios, ficando a cultura para o resto dos sintomáticos com baciloscopia negativa⁹⁵.

Além da sensibilidade, a especificidade da cultura também é elevada e a técnica tem sido considerada um instrumento diagnóstico complexo, caro e especializado, o que reduz sua utilização generalizada⁹⁵. Várias técnicas de cultura têm sido pesquisadas, de forma a permitir o diagnóstico da tuberculose por este meio na rotina de laboratórios de Saúde Pública^{3,24,29,37,41,44,49,57,68,77,84,97,110,121,122,128,133,148}.

Nos países em desenvolvimento a tuberculose pulmonar é considerada confirmada bacteriologicamente em pacientes onde o BK é detectado através do exame de esfregaço do escarro corado, com possibilidade bem menor de realização da cultura^{41,87,107}. Como estes pacientes são considerados mais contagiosos e o aspecto econômico influi na execução ou não da cultura, os programas de controle da tuberculose nestes países são baseados no diagnóstico e tratamento desses casos^{41,87}.

O assunto tem sido bastante debatido, verificando-se a necessidade e a possibilidade de realização da cultura para BK em sintomáticos respiratórios e os efeitos sobre a eficiência da descoberta de casos, empregando um grupo reduzido de laboratórios selecionados¹⁴⁰. A organização em diversos níveis, com atividades mais ou menos complexas, permite aos laboratórios oferecerem uma retaguarda para o melhor diagnóstico e tratamento da tuberculose pulmonar^{56,66,80}. Nos países em desenvolvimento a capacitação para realização da cultura deve ser ampliada, até que alternativas econômicas, específicas e sensíveis para diagnóstico da tuberculose sejam desenvolvidas ou melhoradas¹⁰⁷.

No Brasil, o Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública inclui em sua estrutura a Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública para o Diagnóstico da Tuberculose, contando com laboratórios de referência de níveis nacional, regional e estadual, além dos laboratórios locais que darão apoio ao Programa Nacional de Controle da Tuberculose desenvolvendo ações voltadas para o diagnóstico laboratorial⁸².

A aplicabilidade dos instrumentos utilizados para diagnóstico deve orientar-se por conhecimentos da situação específica de detecção de casos. É mais prático ajustar um método às necessidades da situação em uma área determinada do que escolher um método já elaborado. O método mais adequado aos centros urbanos pode ser diferente do recomendado para áreas rurais do mesmo país. A microscopia do esfregaço de escarro é perfeitamente adequada para a detecção de casos em instituições rurais de saúde e em dispensários e centros de saúde simples⁹⁵.

Na tentativa de reduzir a complexidade da cultura para que venha a ser utilizada como rotina em regiões carentes e distantes, várias técnicas simplificadas têm sido criadas e estudadas em todo o mundo^{3,24,68,84,96,110,121,128,133,148}, a exemplo de KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) que propuseram uma técnica simplificada para descontaminação de amostras de escarro que utiliza swab de algodão e hidróxido de sódio, com semeadura direta em meio de cultura de Ogawa modificado.

Entre as várias técnicas de cultura simplificadas existentes, a descrita por Kudoh & Kudoh⁶⁸ em 1974 foi selecionada para este estudo por incluir procedimentos simples que podem favorecer sua reprodutibilidade em áreas carentes de recursos de laboratório, parecendo indicada para Rede de Laboratórios de Saúde Pública em regiões distantes onde laboratórios simples executem procedimentos básicos de descontaminação e semeadura remetendo as culturas para acompanhamento nos níveis superiores da rede.

A manipulação reduzida da amostra e a não utilização de mecanismos de agitação/centrifugação, favorece a execução da técnica em laboratórios simples, reduzindo a produção de aerossóis e, conseqüentemente, a contaminação ambiental e do pessoal de laboratório.

Além disto, a adoção de uma técnica de cultura mais simples, possível de ser empregada em áreas carentes e distantes, traz como grande vantagem a melhoria na qualidade do diagnóstico bacteriológico da tuberculose nessas regiões, favorecendo a busca de casos e propiciando ainda estudos de sensibilidade/resistência a drogas e identificação de micobactérias atípicas.

OBJETIVOS

1. Verificar a exequibilidade e viabilidade de utilização, para diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar em Saúde Pública, da técnica de descontaminação de amostras de escarro descrita por Kudoh & Kudoh e sementeada em meio de Ogawa modificado, comparado com a técnica de descontaminação de Petroff e sementeada em meio de cultura de Lowenstein-Jensen.

2. Verificar a capacidade de crescimento de micobactérias provenientes de amostras paucibacilares cultivadas pela técnica de Kudoh & Kudoh, comparando as contagens de colônias obtidas pelas duas técnicas de cultura com os resultados da bacilosopia executada pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara.

3. Verificar e comparar a estimativa de custos dos produtos utilizados nos dois métodos de descontaminação e cultura.

4. Verificar a capacidade de sobrevivências do *Mycobacterium tuberculosis*, após descontaminação de amostras de escarro pela técnica descrita por Kudoh & Kudoh e sementeada em meio de Ogawa modificado, mantidas fora da estufa por período de até 120 horas, antes da incubação.

MATERIAL E MÉTODOS

1- AMOSTRAS

Utilizaram-se amostras de escarro recebidas pelo Laboratório do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) para diagnóstico de tuberculose ou controle de tratamento de pacientes. Após submetidas ao exame direto por coloração de Ziehl-Neelsen mantinham-se armazenadas em geladeira até o momento do transporte e encaminhavam-se para o Laboratório da Disciplina de Higiene Social (LHS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara (FCF/CAR) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), onde permaneciam sob refrigeração até o momento da análise, geralmente feita no mesmo dia.

Para o estudo comparativo entre técnicas de cultura utilizaram-se 503 amostras de escarro cedidas pelo Laboratório do SESA, sendo 461 (91,7%) encaminhadas para diagnóstico da tuberculose pulmonar e 42 (8,3%) para controle e tratamento de pacientes. As amostras foram encaminhadas entre os anos de 1991 e 1993, sem informação prévia do resultado do exame e identificadas apenas pelo número do laboratório. Renumerava-se a amostra por ordem de chegada e anotavam-se os dois códigos numéricos em ficha própria para cada amostra (Anexo 1). Os dados referentes ao nome do paciente, sexo, amostra para diagnóstico ou controle de tratamento e o resultado do exame direto, foram anotados em cada ficha após o término do experimento, a partir dos dados registrados no livro do laboratório do SESA.

As amostras cedidas pelo SESA e encaminhadas para o desenvolvimento desta pesquisa no LHS-FCF/CAR-UNESP, eram amostras não empregadas para

cultura de rotina no laboratório, ou seja, amostras que foram submetidas apenas ao exame por baciloscopia por não haver indicação de realização da cultura.

Neste experimento 14 amostras foram excluídas, sendo 7 por não conter material e 7 por ter material suficiente apenas para a realização da técnica simplificada descrita por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974).

Para o estudo da sobrevivência do BK semeado em meio de Ogawa modificado após descontaminação da amostra pela técnica simplificada descrita por Kudoh & Kudoh⁶⁸, utilizaram-se 43 amostras positivas ao exame de esfregaço corado pelo Ziehl-Neelsen realizado no Laboratório do SESA, recebidas entre setembro de 1994 e agosto de 1995.

A coleta, conservação e transporte das amostras recebidas pelo SESA e encaminhadas para análise no LHS-FCF/CAR-UNESP, seguiram recomendações do Ministério da Saúde^{80,82}.

2 - MEIOS DE CULTURA

Para a técnica descrita por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974), utilizou-se o meio de cultura de Ogawa modificado. Para a técnica recomendada pelo Ministério da Saúde⁸⁰ (modificado), empregou-se o meio de cultura de Lowenstein-Jensen.

2.1- Meio de Cultura de Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh⁶⁸

(OK)

Fosfato monopotássico anidro.....	2,0g
Citrato de magnésio.....	0,1g
Glutamato de sódio.....	0,5g
Glicerina bidestilada.....	4,0mL
Água destilada.....	100,0mL
Ovos integrais homogeneizados.....	200,0mL
Verde malaquita 2%.....	4,0mL
O pH do meio de Ogawa modificado por Kudoh é ácido ⁹⁶ .	

2.2- Meio de Cultura de Lowenstein-Jensen^{68,80} (LJ)

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

O pH deste meio é neutro.

Para o preparo de cada partida dos meios de cultura utilizaram-se cinco vezes as quantidades dos componentes das fórmulas originais, que forneceu a média de 80 tubos de cada meio de cultura.

Os dois meios diferem basicamente pela presença de glutamato de sódio no meio de Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh (OK) e de asparagina e sulfato de magnésio no meio de Lowenstein-Jensen (LJ); os demais componentes são iguais, com pequenas diferenças nas quantidades.

Os meios de cultura de Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh (OK) e o meio de Lowenstein-Jensen (LJ), foram preparados no LHS-FCF/CAR-UNESP, de acordo com as especificações e recomendações^{68,80,94}.

3- COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE DESCONTAMINAÇÃO DE AMOSTRA DESCRITA POR KUDOH & KUDOH (SEMEADA EM MEIO OGAWA MODIFICADO) E A TÉCNICA DE DESCONTAMINAÇÃO DE PETROFF (SEMEADA EM MEIO LOWENSTEIN-JENSEN)

Neste experimento comparou-se a técnica de descontaminação de amostras de escarro pela técnica de Petroff recomendada pelo Ministério da Saúde do Brasil^{80,82} (modificado) utilizando-se meio de cultura de Lowenstein-Jensen (PLJ), com a técnica de descontaminação simplificada descrita por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) e meio de Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh (KOK).

Para este experimento submeteram-se todas as amostras recebidas a ambas as técnicas de descontaminação e cultura, executadas paralelamente pelo mesmo pessoal do laboratório e sob condições idênticas.

Para a semeadura da parte da amostra descontaminada pela técnica de KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) utilizaram-se dois tubos de meio de cultura de Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh e para a técnica de descontaminação de Petroff^{80,101,102} usaram-se dois tubos de meio de cultura de Lowenstein-Jensen. Desta forma, seguiu-se uma regra básica utilizada nos laboratórios de bacteriologia da tuberculose que recomenda a cultura em duplicata para *M. tuberculosis*.

Para anotações de dados relativos a cada amostra e resultados das análises, utilizou-se formulário apresentado no Anexo 1.

Descreve-se abaixo as técnicas de cultura utilizadas no experimento.

3.1- Técnica de Descontaminação - KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974)

- Material (Figura 1)

. **Swab** esterilizado (haste de madeira com 20cm de comprimento e 0,05 a 0,1g de algodão enrolado na extremidade)

. Tubos de ensaio (18 x 180mm) contendo solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4%, em volume suficiente para cobrir o algodão do **swab** estéril (cerca de 6 mL).

. Meio de Cultura - Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh (OK) - dois tubos de cultura com meio sólido inclinado, para cada amostra. Os tubos de cultura tinham tamanho variado (18 a 20mm de diâmetro por 180 a 200mm de comprimento).

- Descrição da Técnica

. Colocavam-se os recipientes contendo as amostras de escarro (já numerados) sobre a bancada de trabalho coberta com papel embebido em desinfetante (Formaldeído PA - sol 36-38%).

. Disponham-se em uma estante os tubos de ensaio contendo hidróxido de sódio - numerava-se um tubo correspondente para cada amostra.

. Em outra estante, distribuíam-se tubos de cultura contendo meio Ogawa modificado por Kudoh; numeravam-se dois tubos para cada amostra.

. Utilizava-se **swab** (um para cada amostra) para retirar parte da porção mais densa ou purulenta do material.

. Mergulhava-se o **swab** no tubo correspondente contendo solução de hidróxido de sódio a 4%, com cuidado para não tocar suas paredes; prendia-se a haste do **swab** com o tampão de algodão e deixava-se por 1 a 2 minutos.

Figura 1 - Material usado no processo de descontaminação e semeadura de amostras de escarro, pela técnica simplificada de Kudoh & Kudoh.

Retirava-se o **swab** do hidróxido de sódio e fazia-se a semeadura girando-o sobre a superfície do meio sólido inclinado de Ogawa modificado (OK).

. Incubava-se a 37°C.

OBS.: É importante que o tempo de permanência do material (**swab**) na solução de hidróxido de sódio não ultrapasse o período máximo de 2 (dois) minutos; recomenda-se processar as amostras de duas em duas de maneira a não ultrapassar este tempo.

. Acondicionava-se o tubo em caixa de madeira com apoio para inclinação, permanecendo com a rolha frouxa durante as primeiras 48 horas para evaporar o líquido das semeaduras. Após este prazo, se o líquido já tivesse evaporado, ajustava-se bem a rolha.

. Posteriormente, mantinha-se o tubo em posição horizontal ou vertical, de acordo com o espaço disponível na estufa.

3.2- Técnica de Descontaminação - Petroff^{80,82,101,102}

- Material

- . Solução de hidróxido de sódio 3% - estéril.
- . Vermelho de fenol: 0,1g/25mL H₂O destilada.
- . Solução de ácido clorídrico 2N.
- . Centrífuga - 3.000 RPM.
- . Agitador de Kahn ou similar.
- . Meio de cultura - Lowenstein-Jensen (LJ). Dois tubos para cada amostra; meio sólido inclinado. Os tubos de cultura tinham tamanho variado (18 a 20mm de diâmetro e 180 a 200mm de comprimento).

Obs.: No manual do Ministério da Saúde^{80,82} utiliza-se solução de hidróxido de sódio a 4% e segundo PETROFF^{101,102} (1915) solução de hidróxido de sódio a 3%.

- Descrição da Técnica

. Colocavam-se os potes de escarro já numerados sobre a bancada de trabalho revestida com papel embebido com desinfetante (Formaldeído PA - 36 a 38%).

. Em uma estante distribuía-se igual número de tubos de centrifuga estéreis numerados de acordo com as amostras.

. Dispunha-se em cada tubo cerca de 2mL da amostra de escarro correspondente; flambavam-se as bordas do tubo e tampava-se.

. Adicionava-se a cada tubo igual volume (2mL) de hidróxido de sódio a 3% e ajustava-se firmemente a tampa.

. Agitava-se durante 20-30 minutos em agitador de Kahn.

. Centrifugava-se a 3.000 RPM durante 15 minutos.

. Deixava-se em repouso por 5 minutos, sem destampar.

. Eliminava-se cuidadosamente o sobrenadante em recipiente adequado contendo fenol a 5%; flambavam-se as bordas do tubo e tampava-se.

. Neutralizava-se com ácido clorídrico 2N em presença do vermelho de fenol anteriormente incorporado ao hidróxido de sódio. O pH estava entre 6.5 e 7.2.

. Colocava-se sobre a bancada uma estante contendo tubos de cultura (dois para cada amostra) com meio de cultura sólido inclinado de Lowenstein-Jensen (LJ).

. Com uma pipeta de Pasteur ou outro tipo, tomava-se 1mL de cada amostra neutralizada e semeava-se 3 a 5 gotas em cada tubo com meio de

cultura, deixando escorrer pela superfície do meio. Flambava-se a boca dos tubos e fechava-se, acondicionando-os nas caixas com fundo inclinado.

. Incubava-se em estufa a 37°C com a rolha frouxa.

. Após 48 horas, verificava-se se havia evaporação do líquido semeado e apertava-se a rolha.

. Faziam-se leituras semanais e anotavam-se os resultados.

. Após 60 dias dava-se o resultado negativo.

OBS.: Esterilizava-se em autoclave todo o material utilizado e incinerava-se **swabs** e potes contendo restos de amostras.

3.3- Incubação das culturas, leituras e resultados

Incubavam-se os tubos semeados pelos dois métodos, paralelamente na mesma estufa a 37°C, para evitar condições diferentes nesta etapa de manutenção das culturas. Fazia-se controle periódico da temperatura da estufa.

Realizavam-se leituras semanais e anotavam-se os resultados das culturas como segue:

+++ Positivo Colônias confluentes

++ Positivo Colônias separadas (mais de 100)

+ Positivo 20 a 100 colônias

nº Positivo Número de colônias, quando menor que 20

(-) Negativo

(c) Tubo contaminado

Para efeitos de compilação de dados utilizaram-se apenas três resultados (P) positivo; (N) negativo; (c) contaminado. O resultado positivo ou negativo sempre se sobrepunha ao resultado contaminado e o positivo ao negativo, caso ocorresse diferença entre os dois tubos semeados para cada amostra.

3.4- Comparativo de custos de material de consumo, equipamentos necessários e tempo gasto para a execução das técnicas de descontaminação e cultura em estudo

Utilizou-se procedimento simples para avaliação das despesas com as duas técnicas, levantando-se inicialmente o custo do material de consumo (reagentes e outros) utilizado nos processos de descontaminação e na preparação dos meios de cultura.

Um segundo passo foi a avaliação do emprego de equipamentos para a execução das técnicas, tendo em vista sua utilização em laboratórios menos complexos. Quanto a equipamentos, verificou-se apenas aqueles utilizados a mais pela técnica recomendada pelo Ministério da Saúde, considerando-se que estufa de cultura, estufa de esterilização e secagem, autoclave, geladeira, fluxo laminar e bicos de Bunsen são equipamentos comuns e usados para execução das duas técnicas, incluindo aí preparo e conservação dos meios de cultura e reagentes, descontaminação/esterilização de material e demais atividades necessárias.

Estimou-se o tempo necessário para que o pessoal de laboratório manipulasse cada amostra, desde o processo de descontaminação até a semeadura e incubação, comparando-se o tempo gasto na execução de cada uma das técnicas.

3.5 - Análise Estatística

Para se estimar o grau de concordância entre as técnicas de cultura de Petroff (PLJ) e Kudoh & Kudoh (KOK), utilizou-se a estatística do tipo Kappa (K) definida por LIGHT⁷² (1971).

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

sendo "Po" a proporção observada de concordância e "Pe" a proporção esperada de concordância.

Os resultados da concordância de Kappa (K) são interpretados da seguinte forma:

Ruim: <0,0%

Fraca: 0,0% — 21,0%

Sofrível: 21,0% — 41,0%

Regular: 41,0% — 61,0%

Boa: 61,0% — 81,0%

Ótima: 81,0% — 100,0%

Verificou-se também a sensibilidade (S) e a especificidade (E)⁷⁵ da técnica de Kudoh & Kudoh.

$$S = \frac{PV}{PV + NF} \times 100 \quad E = \frac{NV}{NV + PF} \times 100$$

onde o "PV" é o número de positivos verdadeiros, "NV" negativos verdadeiros, "PF" positivo falso e "NF" negativo falso⁷⁵.

4- SOBREVIVÊNCIA DO BACILO DA TUBERCULOSE EM TEMPERATURA AMBIENTE, APÓS DESCONTAMINAÇÃO E SEMEADURA PELA TÉCNICA DESCRITA POR KUDOH & KUDOH

Para este experimento utilizaram-se apenas 43 amostras positivas ao exame direto (exceto uma) (baciloscopia) recebidas pelo Laboratório do SESA e encaminhadas ao LHS-FCF/CAr-UNESP.

Submetia-se cada uma das 43 amostras ao processo de descontaminação descrito por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974), citado no item 3.1; preparava-se 7 culturas por este processo e procedia-se da seguinte maneira: incubava-se imediatamente dois tubos na estufa como o procedimento normal para cultura do *M. tuberculosis*, acondicionava-se os cinco tubos restantes em uma caixa de isopor com termômetro de máxima e mínima e acomodava-se esta caixa no porta-malas de um veículo, para simulação do transporte das amostras semeadas (Figura 2).

A cada 24 horas retirava-se um dos cinco tubos da caixa, anotava-se a temperatura máxima e mínima no período e colocava-se a cultura na estufa com os dois tubos incubados logo após a semeadura. Isto acontecia nas 24, 48, 72, 96 e 120 horas após semeadura da amostra, simulando-se a permanência das culturas fora da estufa por até 120 horas, tempo máximo considerado suficiente para qualquer transporte de amostra feito por via terrestre em uma região com condições de deslocamento precárias.

Após incubados, faziam-se leituras periódicas das amostras, conforme descrito no item 3.3.

Os dados referentes a cada amostra, as temperaturas medidas e os resultados das leituras, anotavam-se em fichas (Anexo 2).

Figura 2 - Caixa de isopor com termômetro e suporte para tubos de ensaio, utilizada na simulação do transporte de amostras já semeadas.

RESULTADOS

Os resultados das culturas e exame direto estão representados da seguinte forma:

P = positivo

nP= não positivo (negativos e contaminados)

N = negativo

C = contaminado

nC= não contaminado (positivos e negativos)

Em algumas tabelas utilizaram-se as siglas "nP" para agrupar culturas com resultados negativos e contaminados e "nC" para agrupar culturas com resultados positivos e negativos, com objetivo de definir de maneira mais clara o número de culturas com resultados positivos e contaminados em relação ao total de amostras. Sabe-se que culturas totalmente contaminadas podem ocorrer em amostras positivas ou negativas pois o crescimento exagerado da microbiota associada pode inibir o crescimento de colônias de BK, tornando necessária a repetição da cultura.

Como dado constante das fichas de cada amostra, utilizou-se o resultado do exame por esfregaço de escarro corado pela técnica de Ziehl-Neelsen fornecido pelo SESA e relacionou-se estes resultados com os resultados das culturas pelas duas técnicas.

Independente da solicitação do exame para diagnóstico ou controle de tratamento, os resultados das culturas pelas técnicas PLJ e KOK foram relacionados aos resultados da baciloscopia fornecido pelo SESA e constam na Tabela 1. Observa-se que 23 (4,6%) das 503 amostras tiveram resultados positivos nas três técnicas e 447 (88,8%) apresentaram resultados não positivos. Das amostras positivas ao exame do esfregaço corado 3 (0,6%) tiveram resultado positivo para PLJ e não positivos em KOK, 7 (1,4%) não positivos em PLJ e positivos em KOK e 14 (2,8%) não positivos para as duas técnicas de cultura. Das amostras negativas ao exame microscópico, 3 (0,6%) foram positivas para as duas técnicas de cultura, 3 (0,6%) positivas ao PLJ e não

positivas em KOK e 3 (0,6%) não positivas em PLJ e positivas em KOK (Tabela 1). Das 14 amostras positivas para bacilosocopia e negativas para cultura pelas duas técnicas, 12 são de pacientes em controle de tratamento (observar Tabelas III e III.A do Anexo 4).

TABELA 1 - Distribuição das amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento, de acordo com resultados obtidos na bacilosocopia e nas culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

DIRETO	PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
P	P	P	23	4,6
P	P	nP	3	0,6
P	nP	P	7	1,4
P	nP	nP	14	2,8
N	P	P	3	0,6
N	P	nP	3	0,6
N	nP	P	3	0,6
N	nP	nP	447	88,8
TOTAL			503	100,0

A Tabela 2 apresenta a comparação entre as contagens de colônias de micobactérias em culturas executadas pelas técnicas PLJ e KOK relacionadas aos resultados das leituras da bacilosopia e contagens de bacilos fornecidos pelo SESA, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar. Verifica-se que o comportamento das duas técnicas de cultura foi semelhante em relação a amostras negativas ao exame de esfregaço corado. Nas amostras com bacilosopia positiva (+) o número de amostras não positivas em PLJ foi o dobro de KOK; nas amostras com bacilosopia positiva (+++) duas amostras foram não positivas em PLJ e nenhuma em KOK.

TABELA 2 - Comparação entre contagens de colônias de micobactérias em culturas executadas pelas técnicas PLJ e KOK, relacionadas aos resultados da bacilosopia fornecidos pelo SESA. Araraquara-SP, 1991-1993.

Bacilosopia	nP		+		++		+++	
	PLJ	KOK	PLJ	KOK	PLJ	KOK	PLJ	KOK
N	427	427	4	4	1	2	1	-
+	4	2	4	4	3	1	3	6
++	1	1	1	2	1	-	3	4
+++	2	-	1	2	-	1	5	5

Utilizando-se o número total de 503 culturas executadas indistintamente para diagnóstico ou controle de tratamento, a Tabela 3 apresenta a distribuição encontrada com 26 (5,2%) positivas em ambas as técnicas, 6 (1,2%) positivas em PLJ e não positivas em KOK, 10 (2,0%) não positivas em PLJ e positivas em KOK e 462 (91,6%) não positivas para ambas as técnicas.

TABELA 3 - Distribuição das amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar, de acordo com resultados das culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

PLJ	KOK	Nº DE	%
AMOSTRAS			
P	P	26	5,2
P	nP	6	1,2
nP	P	10	2,0
nP	nP	461	91,6
TOTAL		503	100,0

A Tabela 4 apresenta a distribuição dos resultados obtidos com as culturas executadas nas 461 amostras recebidas para diagnóstico com 24 (5,2%) positivas para as duas técnicas, 3 (0,7%) positiva para PLJ e não positivas para KOK, 7 (1,5%) não positivas para PLJ e positivas para KOK e 427 (92,6%) não positivas para ambas as técnicas. Observa-se o total de 31 amostras positivas em KOK e 27 positivas em PLJ.

TABELA 4 - Distribuição das amostras de escarro recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar, de acordo com resultados das culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
P	P	24	5,2
P	nP	3	0,7
nP	P	7	1,5
nP	nP	427	92,6
TOTAL		461	100,0

Os resultados obtidos com as 42 culturas de amostras de pacientes recebidos para controle de tratamento estão na Tabela 5. Nesse caso, 2 amostras (4,8%) foram positivas pelas duas técnicas de cultura, 3 (7,1%) positivas em PLJ e não positivas para KOK, 3 (7,1%) não positivas em PLJ e positivas em KOK e 34 (81,0%) não positivas para as duas técnicas. Observa-se comportamento igual das duas técnicas com cinco amostras positivas em KOK e igual número em PLJ.

TABELA 5 - Distribuição das amostras de escarro recebidas para controle de tratamento, de acordo com resultados das culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

PLJ	KOK	Nº DE	%
AMOSTRAS			
P	P	2	4,8
P	nP	3	7,1
nP	P	3	7,1
nP	nP	34	81,0
TOTAL		42	100,0

Na Tabela 6 relaciona-se a contaminação das cultura executadas pelas duas técnicas, quando este processo aconteceu nos dois tubos. Assim sendo, considerou-se resultado contaminado apenas quando ocorreu nos dois tubos; os resultados positivos ou negativos se sobrepõem ao contaminado se ocorrer em apenas 1 tubo e o positivo ao negativo no mesmo caso. Observa-se na Tabela 6 apenas 4 (0,8%) positivos em KOK e contaminados em PLJ e nenhum resultado inverso. Verifica-se a ocorrência de 26 (5,2%) positivas pelas duas técnicas e 412 (81,8%) negativas nas duas técnicas.

TABELA 6 - Distribuição das relações entre amostras contaminadas ou positivas e negativas para micobactérias, em culturas realizadas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

PLJ	KOK	Nº DE	%
AMOSTRAS			
P	P	26	5,2
P	C	-	-
P	N	6	1,2
C	C	4	0,8
C	P	4	0,8
N	P	6	1,2
N	C	19	3,8
C	N	26	5,2
N	N	412	81,8
TOTAL		503	100,0

Na Tabela 7 observa-se a distribuição de resultados contaminados e não contaminados de culturas executadas pelas técnicas PLJ e KOK em amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento de pacientes. Verifica-se que o número de 30 (6,0%) amostras contaminadas em PLJ e não contaminadas em KOK é maior que as 19 (3,8%) contaminadas em KOK e não contaminadas em PLJ.

TABELA 7 - Distribuição dos resultados contaminados e não contaminados encontrados em culturas executadas pelas técnicas PLJ e KOK em amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento. Araraquara-SP, 1991-1993.

PLJ	KOK	Nº DE	%
AMOSTRAS			
C	C	4	0,8
C	nC	30	6,0
nC	C	19	3,8
nC	nC	450	89,4
TOTAL		503	100,0

A Tabela 8 apresenta a comparação entre resultados positivos e não positivos de culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ em amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento pelo Laboratório do SESA. As amostras contaminadas estão incluídas como não positivas. Verifica-se que 26 amostras apresentaram resultados positivos concordantes e 461 não positivos; as discordâncias de resultados ocorreram em 16 amostras.

TABELA 8 - Comparação entre resultados positivos e não positivos de cultura executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)		TOTAL
		P	nP	
Técnica de Ogawa/Kudoh (KOK)	P	26	10	36
	nP	6	461	467
TOTAL		32	471	503

Po= 96,8%; Pe= 87,4%; K = 74,7%; S= 81,3%; E= 97,9%

A Tabela 9 apresenta a comparação entre resultados positivos e não positivos de culturas processadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar pelo Laboratório do SESA. Observa-se que os resultados positivos concordaram em 24 e não positivos em 427 amostras analisadas pelas duas técnicas de cultura. Amostras contaminadas estão incluídas como não positivos. Dez amostras tiveram resultados discordantes.

TABELA 9 - Comparação entre resultados positivos e não positivos de culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)		TOTAL
		P	nP	
Técnica				
de	P	24	7	31
Ogawa/Kudoh				
(KOK)	nP	3	427	430
TOTAL		27	434	461

Po= 97,8%; Pe= 88,2%; K = 81,6%; S= 88,9%; E= 98,4%

A Tabela 10 apresenta a comparação entre resultados positivos e não positivos de culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ em amostras de escarro recebidas para controle de tratamento de tuberculose pelo Laboratório do SESA. Amostras contaminadas estão incluídas como não positivos. Observa-se que duas amostras concordaram nos resultados positivos e 34 não positivos; seis amostras tiveram resultados discordantes.

TABELA 10 - Comparação entre resultados positivos e não positivos de cultura executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para controle de tratamento. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)		TOTAL
		P	nP	
Técnica				
de	P	2	3	5
Ogawa/Kudoh				
(KOK)	nP	3	34	37
TOTAL		5	37	42

Po= 85,7%; Pe= 79,0%; K = 31,9%; S= 40,0%; E= 91,9%

Comparando-se apenas os resultados efetivamente positivos e negativos e eliminando-se resultados contaminados presentes em uma ou ambas as técnicas de cultura, até então incluídos como "não positivos", tem-se as relações constantes nas Tabelas 11, 12 e 13.

A Tabela 11 apresenta a comparação entre resultados positivos e negativos de culturas processadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento de tuberculose pelo SESA. Observa-se que os resultados foram concordantes em 26 amostras positivas e 412 negativas e discordantes em apenas 12 casos. Após retirada das amostras com contaminação por uma ou ambas as técnicas de cultura, observa-se que o total de 32 amostras positivas para KOK é igual ao número de positivas para PLJ. Foram eliminadas quatro amostras positivas em KOK e contaminadas em PLJ.

TABELA 11 - Comparação entre resultados positivos e negativos de culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)		TOTAL
		P	N	
Técnica				
de	P	26	6	32
Ogawa/Kudoh				
(KOK)	N	6	412	418
TOTAL		32	418	450

Po= 97,3%; Pe= 86,8%; K = 79,8%; S= 81,3%; E= 98,6%

A Tabela 12 apresenta a comparação entre os resultados positivos e negativos de culturas processadas pelas técnicas KOK e PLJ em amostras de escarro recebidas para diagnóstico de tuberculose pelo Laboratório do SESA. Observa-se concordância entre 24 resultados positivos e 384 resultados negativos e discordância em apenas 8 resultados.

TABELA 12 - Comparação entre resultados positivos e negativos de culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)		TOTAL
		P	N	
Técnica de Ogawa/Kudoh (KOK)	P	24	5	29
	N	3	384	387
TOTAL		27	389	416

Po= 98,1%; Pe= 87,4%; K = 84,6%; S= 88,9%; E= 98,7%

A Tabela 13 apresenta a comparação entre resultados positivos e negativos de culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ em amostras de escarro recebidas para controle de tratamento de tuberculose pelo Laboratório do SESA. Observa-se concordância em dois resultados positivos e 28 negativos e discordância em 4 resultados. Com a retirada das amostras com resultado contaminado em uma ou ambas as técnicas de cultura, observa-se 3 amostras positivas em KOK e 5 em PLJ; isto devido a duas amostras positivas para KOK e contaminadas em PLJ.

TABELA 13 - Comparação entre resultados positivos e negativos de culturas executadas pelas técnicas de KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para controle de tratamento. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)		TOTAL
		P	N	
Técnica				
de	P	2	1	3
Ogawa/Kudoh				
(KOK)	N	3	28	31
TOTAL		5	29	34

Po= 88,2%; Pe= 79,1%; K = 43,8%; S= 40,0%; E= 96,6%

A Tabela 14 apresenta a comparação entre resultados contaminados e não contaminados em culturas executadas pelas técnicas PLJ e KOK em amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento de pacientes. Verifica-se que a proporção observada de concordância (P_o) é 90,3% a esperada é 89,3% e a concordância de Kappa 9,3%.

TABELA 14 - Comparação entre resultados contaminados e não contaminados de culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)		TOTAL
		C	nC	
Técnica de Ogawa/Kudoh (KOK)	C	4	19	23
	nC	30	450	480
TOTAL		34	469	503
$P_o = 90,3\%$; $P_e = 89,3\%$; $K = 9,3\%$				

A Tabela 15 apresenta a comparação entre resultados positivos, negativos e contaminados obtidos com as culturas de escarro executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras recebidas para diagnóstico e controle de tratamento de tuberculose pelo Laboratório do SESA. Verifica-se combinação em 26 resultados positivos, 412 negativos e 4 contaminados e discordância em 61 resultados.

TABELA 15 - Comparação entre resultados positivos, negativos e contaminados em culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)			TOTAL
		P	N	C	
<hr/>					
Técnica					
de	P	26	6	4	36
Ogawa/Kudoh	N	6	412	26	444
(KOK)	C	0	19	4	23
<hr/>					
TOTAL		32	437	34	503

Po= 87,9%; Pe= 77,5%; K = 46,2%

A Tabela 16 apresenta comparação entre resultados positivos, negativos e contaminados de culturas executadas pelas técnicas PLJ e KOK em amostras de escarro recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar. Verifica-se que apesar de proporção observada de concordância de 89,2% e esperada de 79,0%, a concordância de Kappa foi de apenas 48,4%.

TABELA 16 - Comparação entre resultados positivos, negativos e contaminados em culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para diagnóstico. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)			TOTAL
		P	N	C	
<hr/>					
Técnica					
de	P	24	5	2	31
Ogawa/Kudoh	N	3	384	25	412
(KOK)	C	0	15	3	18
<hr/>					
TOTAL		27	404	30	461
<hr/>					
Po= 89,2%; Pe= 79,0%; K = 48,4%					

Na Tabela 17 comparam-se resultados positivos, negativos e contaminados obtidos em culturas de amostras executadas pelas técnicas PLJ e KOK em amostras de escarro recebidas para controle de tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar. A proporção observada de concordância foi 73,8%, a esperada 62,4% e a concordância de Kappa apenas 30,3%.

TABELA 17 - Comparação entre resultados positivos, negativos e contaminados em culturas executadas pelas técnicas KOK e PLJ, em amostras de escarro recebidas para controle de tratamento. Araraquara-SP, 1991-1993.

		Técnica de Petroff (PLJ)			TOTAL
		P	N	C	
<hr/>					
Técnica					
de	P	2	1	2	5
Ogawa/Kudoh	N	3	28	1	32
(KOK)	C	0	4	1	5
<hr/>					
TOTAL		5	33	4	42
<hr/>					

Po= 73,8%; Pe= 62,4%; K = 30,3%

A Tabela 18 apresenta o custo do material de consumo utilizado na preparação dos meios de cultura de Lowenstein-Jensen (LJ) e Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh (OK), utilizando-se as quantidades de produtos das fórmulas originais (Anexo 3) multiplicadas por 5, conforme executado nessa pesquisa.

TABELA 18 - Quantidade e custos em reais, dos produtos utilizados na elaboração dos meios de cultura de Lowenstein-Jensen (LJ) e Ogawa modificado por Kudoh e Kudoh (OK). Araraquara-SP, 1995.

Produto	LJ		OK	
	Quantidade	Custo R\$	Quantidade	Custo R\$
Fosfato monopotássico	2,0 g	0,27	10,0 g	1,36
Sulfato de magnésio	0,2 g	0,01	-	-
Citrato de magnésio	0,5 g	0,95	0,5 g	0,95
Glutamato de sódio	-	-	2,5 g	0,09
Asparagina	3,0 g	16,80	-	-
Glicerina bidestilada	10,0 mL	0,26	20,0 mL	0,52
Água destilada	500,0 mL	0,75	500,0 mL	0,75
Ovos homogeneizados	835,0 mL	0,84	1.000 mL	1,00
Verde malaquita 2%	16,5 mL	1,72	20,0 mL	2,08
TOTAL		21,60		6,75

A Tabela 19 apresenta a relação dos produtos utilizados nas técnicas de descontaminação de amostras de escarro descritas por Petroff e Kudoh & Kudoh, associando quantidade e custos para execução dos processos em 100 amostras.

TABELA 19 - Quantidade e custos em reais, dos produtos utilizados para descontaminação de 100 amostras de escarro pelas técnicas de Petroff e Kudoh & Kudoh. Araraquara-SP), 1995.

Produto	Petroff		Kudoh & Kudoh	
	Quantidade	Custo R\$	Quantidade	Custo R\$
Sol. hidróxido de sódio 3%	200,0 mL	0,48	-	-
Sol. hidróxido de sódio 4%	-	-	600,0 mL	1,62
Ácido clorídrico 2N	10,0 mL	0,12	-	-
Vermelho de fenol	10,0 mL	0,08	-	-
Haste de madeira	-	-	100 u	1,00
Algodão	-	-	10,0 g	0,20
TOTAL		0,68		2,82

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos com a simulação do transporte de amostra realizada no segundo experimento. Das 43 amostras utilizadas, 36 foram recebidas para diagnóstico e 7 para controle de tratamento de pacientes. Preparou-se 7 culturas de cada amostra pela técnica KOK; dois tubos foram incubados imediatamente e os cinco restantes incubados um a um a cada 24 horas. Verifica-se que 15 amostras recebidas para diagnóstico e duas para controle, apresentaram todas as culturas positivas após até 120 horas depois de semeadas e antes da incubação. Foi grande o número de amostras negativas à cultura apesar de positivas ao exame direto (ANEXO 5).

TABELA 20 - Distribuição dos resultados das culturas executadas pela técnica KOK incubadas imediatamente e após simulação de transporte por até 120 horas. Araraquara, SP, 1994-1995.

Objetivo do exame	Resultado	Tempo de duração do transporte/horas					
		0	24	48	72	96	120
Diagnóstico	P	24	23	21	18	15	15
	N	12	13	13	13	18	17
	C	-	-	2	5	3	4
Controle de Tratamento	P	3	3	3	2	2	2
	N	2	2	2	3	3	2
	C	2	2	2	2	2	3

DISCUSSÃO

O exame bacteriológico do escarro é considerado seguro e direto para diagnóstico da tuberculose broncopulmonar, por permitir demonstrar de forma precisa a presença do agente etiológico da doença e identificar os casos bacilíferos para serem tratados^{2,27,56,83,119}, embora não seja o melhor.

Considerações sobre a escolha do método bacteriológico no diagnóstico da tuberculose pulmonar em Saúde Pública, foram feitas por NIERO⁸⁸ (1977). O autor afirmou que a escolha de um ou mais métodos de diagnóstico deverá estar assentada também em aspectos epidemiológicos, econômicos, sociais e técnicos. Salientou que o método bacteriológico é importante para os programas de controle da doença, pode ser aplicado a qualquer momento e deve ser constante pois propicia a descoberta dos indivíduos bacilíferos que são as fontes mais importantes de transmissão da doença.

Em Saúde Pública, a baciloscopia é considerada exame básico para diagnóstico da tuberculose humana e controle de pacientes em tratamento, permitindo alcançar uma cobertura ampla em regiões de recursos escassos. Do ponto de vista epidemiológico, atende as necessidades para detecção de casos bacilíferos considerados os mais perigosos como fonte de infecção e disseminação da doença. Isto não significa que este exame seja a melhor técnica para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose^{56,83,87,117,125,128}.

Quando existem recursos suficientes disponíveis, recomenda-se usar a cultura como método de diagnóstico bacteriológico em, pelo menos, uma amostra de cada paciente^{4,7}. Nos países em desenvolvimento, apesar da positividade à baciloscopia ocorrer na maioria dos pacientes com tuberculose pulmonar, o diagnóstico de casos iniciais com baciloscopia negativa e cultura positiva é de grande importância em Saúde Pública^{83,140}.

A detecção de micobactérias por microscopia e cultura permanece fundamental para diagnóstico e monitoramento do tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar^{60,103}. Corretamente empregada, a cultura tem utilidade especial no diagnóstico de casos de tuberculose paucibacilares como as formas pulmonares com baciloscopia negativa, extrapulmonares e tuberculose infantil^{58,70,103}.

É importante que o diagnóstico de tuberculose pulmonar seja feito de maneira precoce². COWIE e cols.²¹ (1985) estudaram um grupo de 152 pacientes positivos a tuberculina mas com diagnóstico bacteriológico (baciloscopia e cultura) negativo; 88 (58%) destes pacientes desenvolveram tuberculose comprovada bacteriologicamente durante os 65 meses posteriores. SALES e cols.¹¹⁵ (1986) estudaram casos inversos, onde a cultura de escarro permitiu a descoberta de casos de tuberculose pulmonar oculta em pacientes com radiografia de tórax aparentemente normal.

Os instrumentos usados para diagnóstico podem ser comparados com base na sensibilidade, especificidade e custos. A sensibilidade mede a capacidade do instrumento para captar os casos verdadeiros entre as pessoas examinadas; quanto maior a sensibilidade, menor o número de casos que passam despercebidos, chamados falsos negativos. A especificidade mede a capacidade para a identificação de casos falso-positivos, quanto maior a especificidade menor o número de casos falso-positivos⁹⁵.

Para ser considerado adequado, o instrumento deve ter um nível mínimo aceitável de sensibilidade e de especificidade. Sua utilidade dependerá da situação para a qual se propõe a sua aplicação e de que seus níveis de sensibilidade/especificidade sejam superiores aos dos outros instrumentos propostos. O custo reflete o gasto total em dinheiro, para cobrir salários,

equipamentos, materiais diversos. A estimativa de custos é muito variável e serve como guia geral para a seleção do instrumento diagnóstico⁹⁵.

A microscopia do esfregaço de escarro é de sensibilidade e especificidade suficientes e custo baixo quando aplicada a sintomáticos respiratórios. A cultura de escarro identifica 20 a 25% mais casos que o simples exame do esfregaço corado entre sintomáticos respiratórios, nas áreas de grande prevalência de tuberculose; entretanto, a execução de dois ou três esfregaços seguidos, repetidos de um mesmo paciente, deixará a sensibilidade da microscopia do esfregaço de escarro muito parecida com a de uma única cultura, sendo que isto pode ocorrer porque os pacientes tuberculosos entre sintomáticos respiratórios de detecção passiva de casos já se encontram em etapa avançada da doença⁹⁵.

Nos Estados Unidos, 56 laboratórios estaduais e territoriais de Saúde Pública foram estudados para verificar o uso rotineiro de métodos rápidos para diagnóstico e teste de suscetibilidade a drogas para *Mycobacterium tuberculosis*. O exame do esfregaço corado de escarro (baciloscopia) ao microscópio é executado em todos os laboratórios, sendo que 40 (71%) usam coloração fluorescente e 16 (29%) coloração convencional. A cultura para micobactéria é executada em 55 (98%) dos laboratórios, sendo que 39 (70%) usam meio sólido como Lowenstein-Jensen ou agar Middlebrook, um laboratório usa exclusivamente método radiométrico e 15 (27%) usam métodos de cultura em meio sólido associados aos radiométricos⁴⁶.

Apesar dos avanços nas áreas de imunologia e biologia molecular, os métodos de diagnóstico bacteriológico de visualização das micobactérias, representados pelo exame do esfregaço de escarro corado e culturas em meios sólidos, ainda são os mais usados em todo o mundo. Inúmeros meios de cultura e técnicas de descontaminação de escarro e semeadura das amostras têm sido experimentados e comparados com técnicas mais avançadas.

O atraso na detecção e tratamento de casos de tuberculose foi estudado por CASAL e cols.¹⁶ (1986) na Espanha e a pouca utilização da bacteriologia era uma das causas deste atraso.

Neste trabalho utilizou-se os resultados dos exames diretos dos esfregaços de escarros corados pela técnica de Ziehl-Neelsen executados no laboratório do SESA.

Na Tabela 1 apresentam-se os dados relativos ao total de 503 amostras recebidas para diagnóstico e controle de tratamento, relacionando-se os resultados das baciloscopias com os resultados das culturas pelas técnicas de PLJ e KOK. Considerando-se o total de amostras verifica-se 23 (4,6%) positivas para baciloscopia e para as duas técnicas de cultura, 14 (2,8%) positivas para baciloscopia e não positivas para as duas técnicas de cultura, 3 (0,6%) positivas para bacilosopia e cultura em PLJ e não positivas para cultura em KOK e 7 (1,4%) amostras positivas para bacilosopia e cultura em KOK e não positivas para cultura em PLJ. Das amostras negativas ao exame do esfregaço corado 447 (88,8%) também foram negativas para ambas as técnicas de cultura e 9 (1,8%) positivas para uma ou ambas as técnicas de cultura.

Desmembrando-se a Tabela 1 observa-se o que acontece com o total de 47 amostras positivas ao exame do esfregaço corado independente do objetivo da análise (Anexo 4). Verifica-se na Tabela I.A que 23 (48,9%) das 47 amostras foram positivas para baciloscopia e para ambas as técnicas de cultura, 3 (6,4%) positivas para baciloscopia e PLJ e não positivas ao KOK, 7 (14,9%) positivas ao exame microscópico e KOK e não positivas ao PLJ; entretanto, 14 (29,8%) foram positivas ao exame do esfregaço corado e negativas aos exames de cultura por qualquer técnica. Na Tabela I.B apresenta-se a distribuição das 456 amostras negativas para baciloscopia relacionadas aos dados obtidos para a cultura pelas duas técnicas, PLJ e KOK. Verifica-se 3 (0,7%) amostras negativas

ao exame microscópico e positivas para as duas técnicas de cultura, 3 (0,7%) negativas na baciloscopia e KOK e positivas ao PLJ e 3 (0,7%) negativas para baciloscopia e PLJ e positivas ao KOK, totalizando 9 (2,1%) amostras com baciloscopia negativa e positivas em pelo menos uma ou ambas as técnicas de cultura (Anexo 4).

Conclui-se das Tabelas 1, I.A e I.B que a utilização do total de amostras recebidas para diagnóstico e controle de tratamento de pacientes não permite uma análise real dos dados e, conseqüentemente, da maior ou menor efetividade dos processos de análise por cultura e de sua relação com a baciloscopia.

Nas Tabelas II e III (Anexo 4) as relações cultura/baciloscopia foram separadas pelo objetivo das análises. Verifica-se que duas amostras de pacientes para diagnóstico foram positivas para baciloscopia e negativas para cultura enquanto esta ocorrência foi observada em 12 amostras de pacientes em controle de tratamento.

Estes resultados negativos para culturas e positivos para baciloscopia seriam mais comuns entre amostras recebidas para controle de tratamento onde o paciente foi submetido a quimioterapia que reduz a viabilidade dos bacilos e impede ou reduz seu crescimento no meio de cultura mas não a sua álcool-ácido resistência que possibilita a coloração e a evidência no exame microscópico.

Para SANTIAGO¹²⁰ (1968) casos positivos à baciloscopia e negativos para cultura são consequência de perda de viabilidade do bacilo ou incapacidade para crescer no meio de cultura. O autor encontrou 1,9% destes casos entre pacientes virgem de tratamento e 2,6% entre pacientes que receberam quimioterapia.

ANDRADE² (1970) acha que é comum a ocorrência de casos em que a cultura é positiva e a baciloscopia negativa porém considera rara a ocorrência da situação inversa.

Segundo NARAIN e cols.⁸⁷ (1971) os casos de baciloscopia positiva e cultura negativa são resultantes de erros de diagnóstico; afirmam que a coloração de Ziehl-Neelsen permite mais erros que a coloração fluorescente.

Relatos a esse respeito foram feitos por DOMINGUEZ & VIVAS²⁵ (1977) que estudaram 6.415 amostras de rotina positivas ao exame microscópico, analisadas simultaneamente por baciloscopia e cultura; 198 (3,1%) das amostras eram de pacientes que haviam recebido quimioterapia e 205 (3,2%) considerados como prováveis erros do laboratório tais como coloração ineficiente e mal interpretação do que apareceu nas lâminas.

Para RATNAN e cols.¹¹⁰ (1987) o alcali pode destruir o bacilo da tuberculose e a redução do hidróxido de sódio aumenta o número de bacilos encontrados.

ALLEN & MITCHISON¹ (1992) realizaram contagens de bacilos viáveis em amostras de escarro submetidas a processos de descontaminação para cultura. Para os autores a estocagem sob refrigeração e o transporte em temperatura ambiente contribui para redução da viabilidade do bacilo mas não da ácido resistência, fazendo com que 3,8% das amostras positivas ao exame do esfregaço corado sejam negativas para a cultura. Além disso, a centrifugação proporciona uma perda de bacilos estimada em 47%.

Muitas pesquisas compararam as técnicas de microscopia do esfregaço (baciloscopia) de escarro corado pela técnica de fluorescência ou Ziehl-Neelsen para bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) e cultura em meio de LJ.

SANTIAGO¹²⁰ (1968) comparou a utilização da baciloscopia e a cultura para o diagnóstico bacteriológico e acompanhamento do tratamento de pacientes com tuberculose. Ainda SANTIAGO¹¹⁸ (1970) fez um levantamento por amostragem de prontuários de pacientes do Laboratório Central de Tuberculose do antigo Estado da Guanabara relacionado principalmente à

baciloscopia e cultura. Para o autor a baciloscopia é uma técnica simples e rápida mas a cultura é mais sensível porém são dois métodos bacteriológicos que se completam e que devem ser feitos simultaneamente, sempre que possível ou quando necessário.

ANDRADE² (1970) entre outros estudos, comparou a baciloscopia e a cultura através de uma revisão nos métodos de diagnóstico de infecções causadas pelo bacilo da tuberculose; para o autor, a baciloscopia é simples e pode ser usada em laboratórios sem grandes recursos, enquanto a cultura requer melhor aparelhagem e pessoal mais especializado, embora permita melhor esclarecimento do diagnóstico e também a realização de testes de sensibilidade à drogas.

NARAIN e cols.⁸⁷ (1971) estudaram casos de tuberculose pulmonar com microscopia positiva e negativa comparados com a cultura. O exame do esfregaço foi realizado pelas técnicas de coloração fluorescente e Ziehl-Neelsen e a cultura em meio de Lowenstein-Jensen. Do total de pacientes com tuberculose 61% foram positivos por exame microscópico. Para os autores as duas técnicas devem ser utilizadas pois o uso de uma ou outra separadamente poderá levar a um número razoável de casos não revelados.

Mitchison citado por CHAN e cols.¹⁸ (1971) afirma que a baciloscopia feita em várias amostras do paciente é quase tão eficiente quanto a cultura.

CHAN e cols.¹⁸ (1971) estudaram as medidas bacteriológicas para descoberta de casos de tuberculose pulmonar, analisando sua eficiência e custos relativos, fornecendo informações e orientações em relação ao esquema de adoção das medidas bacteriológicas para que possam colaborar com os programas nacionais de controle da tuberculose. Estudaram várias alternativas para uso do exame microscópico e cultura separadamente e associados. Verificaram que o uso da baciloscopia em todas as amostras iniciais e de cultura

nos casos da baciloscopia negativa apresenta o mesmo resultado de casos positivos a um custo menor que a utilização do exame microscópico e cultura em todas as amostras iniciais. Este rendimento passa a ser maior quando ambas as técnicas são aplicadas rotineiramente em duas amostras de todos os pacientes porém com custo bem mais elevado.

Para MITCHISON⁸³ (1974) os exames bacteriológicos são os únicos meios de certeza para estabelecer o diagnóstico de tuberculose e são também essenciais para monitoramento do tratamento da doença. Nos países tropicais a maioria dos pacientes com tuberculose pulmonar apresenta positividade ao exame baciloscópico porém, a detecção precoce de casos negativos ao exame microscópico e positivos para cultura são de grande importância em saúde pública pois o tratamento pode ser iniciado antes da infecção ter sido transmitida a outros.

NIERO e cols.⁹⁰ (1978) compararam as colorações de secreções pulmonares executadas pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e fluorescente para evidenciação de bacilos álcool-ácidos resistentes. Para cultura, as amostras foram descontaminadas pela técnica de Darzins e cada uma semeada em 3 tubos com meio de LJ. Para os autores, existe uma associação positiva entre as duas técnicas de coloração para o exame do esfregaço apesar de maior sensibilidade da técnica de fluorescência e com diferenças desprezíveis na especificidade. A cultura tem maior sensibilidade e especificidade que as duas técnicas de exame por baciloscopia.

A correlação entre técnicas de coloração e culturas para micobactérias foi objeto de estudo para KUBICA⁶⁵ (1980); o autor concorda que a microscopia é um meio válido para orientar os estudos e a luta contra as doenças causadas por micobactérias e que a coloração fluorescente apresenta ligeira vantagem em relação ao Ziehl-Neelsen. Para ele, quanto maior o número de bacilos álcool-

resistentes na amostra, melhor a correlação entre os resultados da baciloscopia e da cultura.

MOKHTARI⁸⁴ (1980) estudou técnicas simples de coloração e cultura do bacilo da tuberculose. Para coloração de lâminas usou a técnica TTH que emprega solução de Kinyoum e a de Gabett comparando com o método clássico de Ziehl-Neelsen. Para descontaminação da amostra utilizou brometo de cetilpiridínio a 1% e a semeadura foi feita em meio de cultura de LJ. Concluiu que as duas técnicas são simples, sensíveis, eficazes e de baixo custo, podendo ser utilizadas em países onde a prevalência da tuberculose é elevada e os recursos são escassos.

NIERO & BELO⁸⁹ (1983) afirmaram que de 1.628 casos de tuberculose pulmonar diagnosticadas por exame bacteriológico, entre 1968 e 1982 no Centro de Saúde Geraldo de Paula Souza, 624 (39,6%) foram positivos apenas por cultura.

TRIVELLATO & FERNANDES¹³¹ (1986) utilizaram a cultura de escarro semeado em meio de LJ e compararam com o exame microscópico da amostra fresca e concentrada, coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen. As amostras foram descontaminadas utilizando a solução de fosfato de sódio tribásico a 14%. Para os autores os exames baciloscópicos com amostra concentrada ou não são menos sensíveis que a cultura de escarro; afirmaram que a sensibilidade do método microscópico está relacionada com a partícula da amostra escolhida para confecção do esfregaço e que a concentração da amostra aumenta a sensibilidade da baciloscopia.

BISWAS e cols.¹⁰ (1987) avaliaram um método de flutuação para detecção do bacilo da tuberculose. Após submetida ao processo a porção da amostra era corada pela técnica de Ziehl-Neelsen e comparada com o processo de baciloscopia tradicional e com o método de cultura com descontaminação

pela técnica de Petroff e semeadura em meio de Lowenstein-Jensen. Concluíram que, embora a cultura para o BK seja o método de diagnóstico de tuberculose mais seguro, o esfregaço após o método de flutuação é uma técnica bastante útil.

GRZYBOWSKI e cols.⁴³ (1987) avaliaram os métodos de exame do esfregaço corado por fluorescência e Ziehl-Neelsen e culturas em meio de LJ, comparando com outras técnicas de diagnóstico, para estudar a prevalência de tuberculose em uma população circunscrita do Canadá. Os oito casos descobertos no estudo foram diagnosticados por exames bacteriológicos, baciloscopia e/ou cultura.

Na Argentina, LATINI e cols.⁷⁰ (1988) avaliaram a qualidade dos métodos bacteriológicos empregados no diagnóstico da tuberculose. Neste país os métodos de baciloscopia e cultura são utilizados diferentemente de acordo com o nível dos laboratórios oficiais.

O diagnóstico bacteriológico de tuberculose em pacientes com SIDA tem sido bastante discutido e para PITCHENIK¹⁰⁷ (1990) pode ser mais difícil de estabelecer nos pacientes infectados com VIH, imunodeficientes, já que o escarro pode ser menos sensível pois favorece o aumento na proporção de pacientes com micobactérias atípicas. É necessário que os países em desenvolvimento estejam capacitados para aumentar a frequência do uso da cultura no diagnóstico da tuberculose.

Para GITHUI e cols.³⁹ (1992) os resultados obtidos com a microscopia e a cultura são semelhantes entre os grupos de pacientes com tuberculose pulmonar, positivos ou negativos ao VIH. Micobactérias atípicas não foram isoladas em nenhum caso.

SILVA e cols.¹²⁵ (1992) estudaram as atividades do Instituto Adolfo Lutz em Sorocaba-SP no que se refere à bacteriologia da tuberculose. Para os autores, a baciloscopia constitui uma arma importante para o controle da tuberculose

mas a cultura permite um aumento significativo na descoberta de casos e o isolamento e identificação do *M. tuberculosis* e de outras micobactérias. Para o exame microscópico utilizaram a coloração de Ziehl-Neelsen.

Na Colômbia, LEÓN e cols.⁷¹ (1993) avaliaram a qualidade técnica da baciloscopia de escarro realizada com finalidade de diagnóstico na rede de laboratórios de bacteriologia da tuberculose. As leituras foram realizadas por pessoas com diferentes níveis de formação embora todos tenham a mesma capacitação técnica; entretanto houve variação na qualidade das leituras pois houve diferença entre as percentagens de concordância entre as lâminas positivas e negativas.

GEBRE e cols.³⁶ (1995) estudaram melhorias no uso da microscopia para diagnóstico da tuberculose pulmonar nos países em desenvolvimento. Compararam o resultado da baciloscopia em esfregaço feito diretamente do escarro, com a microscopia após liquefação do escarro com hipoclorito de sódio e centrifugação para concentração de bactérias, sendo o esfregaço corado pela técnica tradicional. Para os autores, a técnica de concentração aumentou em mais de 100% o número de amostras positivas, com a sensibilidade passando de 30,8% no esfregaço corado diretamente para 69,2% no esfregaço tratado com hipoclorito de sódio e centrifugado, além do aumento do número de bacilos por campo microscópico. A especificidade foi de 100% para ambas as técnicas. Por outro lado, a ação desinfetante do hipoclorito reduz o risco de infecções laboratoriais. Consideram a técnica apropriada para países em desenvolvimento pois sua aplicação pode aumentar a eficiência dos programas de controle.

O exame por esfregaço também pode ser usado para identificação de micobactérias a partir das culturas. Suspensões de colônias micobacterianas foram preparadas com água destilada esterilizada; os esfregaços foram preparados, fixados e corados pela técnica de Kinyoun que é uma modificação

da técnica de Ziehl-Neelsen. A técnica se baseia na presença ou ausência de cordões com ou sem bacilos dispersos. O grau de correlação entre a técnica de identificação de micobactérias sobre lâminas e o teste da niacina foi de 92,7 a 97,0%, sendo a técnica recomendada como um procedimento simples para identificação preliminar nos países em desenvolvimento³⁴.

As técnicas de cultura para micobactérias utilizam um processo prévio de digestão e descontaminação das amostras de escarro sendo vários os métodos estudados e utilizados. Nestes processos pode haver destruição e/ou redução da viabilidade dos bacilos pela utilização do hidróxido de sódio⁸⁰ e outros descontaminantes.

O emprego sistemático da cultura para o diagnóstico da tuberculose em programas de Saúde Pública já era recomendado por GERNEZ-RIEUX e cols.³⁷ (1968) desde que as condições econômicas permitissem sua utilização.

O crescimento lento das micobactérias demanda a necessidade de novas descobertas para agilizar o decréscimo de tempo necessário para o desenvolvimento destes microrganismos^{49,136} nos meios de cultura.

O meio de cultura de Lowenstein-Jensen e a técnica de descontaminação de amostra de Petroff são utilizados em todo o mundo⁹⁴, considerados como padrão para cultivo de *M. tuberculosis* e, por este motivo, grande número de pesquisas tem sido realizadas comparando estas técnicas com outras técnicas bacteriológicas ou técnicas mais sofisticadas e modernas.

A primeira referência a esta técnica de descontaminação foi descrita por PETROFF^{101,102} (1915), como um método novo e rápido para o isolamento e cultivo do bacilo da tuberculose diretamente do escarro e fezes, tendo em vista que o autor considerava que os métodos utilizados durante os 20 anos anteriores não davam resultados uniformemente positivos. No processo de descontaminação descrito, partes iguais de escarro fresco (cerca de 5mL) e

hidróxido de sódio (solução a 3%) eram misturados e deixados na estufa por 20 a 30 minutos até o escarro estar bem digerido. Na presença de papel de tornassol neutralizava-se a mistura com ácido hidrocloreídrico normal, centrifugava-se e o sedimento era inoculado em um meio de cultura contendo ovos, caldo de carne e violeta de genciana^{101,102}.

A técnica recomendada pelo Ministério da Saúde do Brasil^{80,82} e mais difundida⁹⁴ determina a utilização da solução de hidróxido de sódio a 4%, diferente do citado originalmente por Petroff^{101,102}.

Discute-se frequentemente a ação dos produtos usados no processo de descontaminação de amostras de escarro, que podem reduzir a viabilidade de crescimento do BK no meio de cultura e/ou destruir grande parte dos bacilos presentes, prejudicando principalmente as amostras com quantidade reduzida de bacilos. Neste experimento comparou-se os resultados das contagens de colônias em culturas executadas pelas técnicas PLJ e KOK com os resultados das baciloscopias executadas pelo SESA.

Na Tabela 2 observam-se as relações entre os resultados da bacilosopia executada pelo laboratório do SESA e as contagens de colônias em culturas executadas pelas técnicas PLJ e KOK. Nas amostras negativas para bacilosopia consideradas paucibacilares verifica-se comportamento semelhante entre as duas técnicas de cultura; nas amostras com bacilosopia positiva (+) ainda paucibacilares, a técnica KOK apresentou leve vantagem sobre PLJ, o mesmo ocorrendo nos demais casos. Observa-se que a técnica KOK, mesmo sem processos de concentração de bacilos apresentou vantagens em relação a PLJ, sugerindo uma destruição menor de bacilos nos processos de descontaminação simplificado.

WAISBICH & BARROS¹³⁴ (1967) estudaram o crescimento do *M. tuberculosis* no meio de Lowenstein-Jensen e neste mesmo meio adicionado

com 0,025 microgramas de ácido ribonucleico por mL de meio. A descontaminação foi feita com hidróxido de sódio 1N centrifugado e neutralizado pelo ácido clorídrico e fenolftaleína como indicador. A semeadura foi feita em duplicata para cada meio com o auxílio de **swabs** esterilizados. No meio de Lowenstein-Jensen com RNA a positividade foi maior que no meio tradicional e o tempo médio de crescimento menor no meio com RNA.

A N-acetyl-cisteína, lauril-sulfato de sódio, NEkAl-BX e fosfato trissódico são substâncias estudadas para que possa reduzir a concentração do hidróxido de sódio nos processos de descontaminação/digestão do escarro pois o hidróxido de sódio do método de Petroff destrói uma certa proporção de micobactérias, além de destruir a microbiota associada⁸⁰.

KUBICA e cols.⁶⁷ (1964) estudaram a N-acetil-cisteína como um novo agente mucolítico para digestão do escarro para isolamento de micobactérias, revelando que sua utilização associada ao hidróxido de sódio é superior ao hidróxido de sódio a 4%.

Amostras tratadas com hidróxido de sódio porém não neutralizadas e inoculadas em meio de cultura contendo ácido pirúvico e em meio com glicerol e ovos foram testadas, da mesma forma que amostras centrifugadas. O processo de descontaminação sem centrifugação foi comparado com as técnicas onde o depósito centrifugado foi semeado no meio com ácido pirúvico e no meio de LJ²⁴.

WAISBICH e cols.¹³⁵ (1971) compararam o meio de cultura de LJ com o meio da "American Trudeau Society" (ATS), após descontaminação pela técnica de Petroff. Concluíram que o meio LJ é superior em resultados positivos porém o índice de contaminação foi levemente elevado. Aham conveniente a utilização de mais de um meio de cultura para o isolamento do bacilo da tuberculose.

FODOR & SZABO³¹ (1973) realizaram uma pesquisa para comprovar a efetividade do meio de LJ usado na Hungria. Verificaram que ocorreram diferenças no preparo dos meios de cultura que provocaram alterações nos resultados quando os laboratórios foram comparados.

GONTIJO FILHO & NASCIMENTO⁴¹ (1973) compararam a eficiência do meio de cultura de Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H10 para cultivo primário do *M. tuberculosis* a partir de amostras de escarro. O meio LJ foi superior ao meio sintético 7H10 muito usado nos Estados Unidos. O escarro foi tratado pelo método de Tacquet que utiliza lauril-sulfato de sódio alcalinizado, neutralizado com ácido ortofosfórico.

ENGEL & SEKHUIS²⁹ (1977) realizaram pesquisa comparando vários métodos de isolamento de *M. tuberculosis* a partir de amostras de escarro. Usaram quatro métodos diferentes para descontaminação: Petroff com hidróxido de sódio a 4% e ácido sulfúrico a 6%, o método do lauril-sulfato de sódio e N-acetil-L-cisteína (NALC). Os meios de cultura usados foram: 7H10, Lowenstein-Jensen recomendado pela UICter, Lowenstein-Jensen com modificação R.I.V. e o meio de Stonebrink piruvato.

ZAHER & MARKS¹⁴⁸ (1977) estudaram vários métodos e meios de cultura para o bacilo da tuberculose. Descreveram quatro procedimentos para preparação de amostras com inóculos altamente alcalino, moderadamente alcalino, neutro ou levemente ácido e moderadamente ácido. Utilizaram o meio de LJ e variações da concentração de NaOH (3 e 4%) na técnica de descontaminação de Petroff.

Para FODOR & cols.³² (1981) o brometo de cetilpiridínio usado para descontaminação de amostras de escarro pode dar resultados falsamente positivos se os testes de niacina forem efetuados no mesmo meio de LJ inoculado originalmente.

SATHIANATHAN & KHALIL¹²¹ (1981) compararam a técnica de descontaminação tradicional, utilizando hidróxido de sódio a 4%, centrifugação e neutralização, com a técnica simplificada que utiliza uma solução de 20g de brometo de cetrímonia e 40g de hidróxido de sódio para 1.000 mL de água destilada. Na técnica simplificada a amostra é tratada com a solução citada (misturada volume a volume) e porção da mistura retirada com um **swab** esterilizado e semeado sobre a superfície do meio sólido. Ambas as técnicas utilizaram o meio de cultura da UICTER. Os autores consideraram o método simplificado tão bom quanto o método padrão da UICTER pois promove crescimento rápido do bacilo da tuberculose, reduz os índices de contaminação e é de fácil aplicação por não necessitar de equipamentos complexos; o método é econômico em termos de trabalho e material, podendo ser usado em longa escala nos programas de controle.

PALHANO JUNIOR e cols.⁹⁷ (1984) estudaram um meio de cultura alternativo considerado simples, o ágar base de Dubos & Middlebrook comparado com o meio de LJ. A descontaminação foi realizada pela técnica de Petroff. As diferenças mais acentuadas entre os meios estão relacionadas ao tempo de crescimento e morfologia das colônias.

MEDEROS e cols.⁷⁷ (1986) utilizaram cepas de micobactérias para estudos dos meios de cultura da UICTER e este meio modificado, Santon agar modificado e Middlebrook. Para os autores os meios de cultura têm sido bastante estudados principalmente depois da criação do meio de Lowenstein-Jensen.

RATNAM e cols.¹¹⁰ (1987) reavaliaram o procedimento de descontaminação de amostras por N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio e concluíram que o método pode ser simplificado sem afetar o índice de isolamento ou crescimento e sem aumentar o índice de contaminação, além de

reduzir as chances de auto-contaminação no processamento das amostras. A concentração de hidróxido de sódio pode ser reduzida de 2 para 1,5%.

VASANTHAKUMARI¹³³ (1990) estudou um método simples de cultura para bacilo da tuberculose; preparou um meio de transporte e o escarro é coletado diretamente no frasco com o meio, agitado e deixado em repouso. Depois de algum tempo o sobrenadante é desprezado e o depósito inoculado em meio de Lowenstein-Jensen. Este método foi comparado com o Petroff e a positividade obtida com o método simplificado foi maior, 24,4% contra 21,2% do método convencional. Comparado com o método da N-acetil-L-cisteína/hidróxido de sódio a positividade foi de 22,7% pelo método deste autor contra 25,6% para NALC/NaOH. Comparado com o método do cloreto de cetilpiridínio com 15,5% de positividade a técnica descrita pelo autor teve 21,4% de culturas positivas. Comparada com a técnica de swab de Nassau que teve 9,7% de culturas positivas, a técnica de Vasanthakumari apresentou positividade em 21,6% das amostras.

KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) estudaram uma técnica simples para cultivar o bacilo da tuberculose e compararam com várias técnicas de cultura. No primeiro experimento a técnica utilizada no Japão (na qual uma parte de escarro é tratado com 4 partes de solução hidróxido de sódio a 4%, misturado por 2 minutos e espalhada sobre o meio de Ogawa com o auxílio de pipeta) foi comparada com a técnica do **swab** da Organização Mundial de Saúde (na qual a amostra é colocada em 2 **swabs** de algodão e imersos em solução de ácido oxálico a 5% por 35 minutos, transferidos para solução de citrato de sódio a 5% por 10 minutos e posteriormente semeadas sobre o meio de LJ). Neste experimento a positividade foi de 57,6% pela técnica de Ogawa e 51,4% pelo método da OMS; a contaminação parcial ou total dos meios foi maior na técnica da OMS.

No segundo experimento KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) compararam o método do swab da OMS descrito no parágrafo anterior, com o novo método de cultura com **swab** (item 3.1) em meio de Ogawa. Das 120 amostras testadas pelos dois métodos, 33% foram positivas pelo método da OMS e 37,5% pelo novo método em estudo. Contaminação parcial do meio foi menor pelo novo método enquanto a contaminação total foi percentualmente igual para ambos.

No terceiro experimento realizado por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) o estudo comparativo foi feito entre os meios de LJ, Ogawa e Ogawa modificado, usando a nova técnica de cultura com **swab**. As fórmulas dos meios de cultura estão apresentados no Anexo 3. Neste experimento os autores concluíram que o meio de Ogawa modificado tem uma atividade tampão de variação ampla para o pH do inóculo e que pode manter o crescimento do bacilo da tuberculose em condições iguais aos meio de LJ e Ogawa.

KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) também compararam o método de cultura com swab da OMS com o novo método em meio de Ogawa modificado. Das 302 amostras analisadas 51 (16,9%) foram positivas pelo método da OMS e 54 (17,9%) positivas pelo método proposto pelos autores. Neste caso, os dois métodos foram semelhantes no que diz respeito a positividade e também a contaminação total e parcial dos meios.

OROZCO e cols.⁹⁶ (1985) compararam o método de descontaminação de amostras de Petroff semeadas em meio de LJ com a técnica do swab em meio de Ogawa modificado por Kudoh. Utilizaram duas séries de escarro, uma com 150 e outra com 180 amostras, processadas da seguinte maneira: baciloscopia de acordo com a técnica da Organização Panamericana de Saúde; porção da amostra impregnada no swab, introduzida na solução de hidróxido de sódio a 4% por 1-2 minutos e semeada em meio de Ogawa modificado; porção restante da amostra processada pela técnica de Petroff e semeada em meio de LJ. As

culturas foram incubadas a 37°C e lidas semanalmente. Neste experimento os autores concluíram que as duas técnicas obtiveram percentagens semelhantes na positividade e contaminação dos dois meios e que a técnica do **swab** é simples e facilita a utilização da cultura nos diversos componentes dos programas de controle da tuberculose, economizando tempo, trabalho e reagentes. Além disso, o pH ácido do meio de Ogawa modificado permite a semeadura direta do **swab** impregnado com escarro e hidróxido de sódio.

Um dos objetivos da presente pesquisa foi verificar se realmente a técnica simplificada descrita por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) era exequível e possível de ser utilizada em situações tão diversas e discrepantes como as encontradas nas diferentes regiões do Brasil, com carências acentuadas de recursos em todos os níveis. Como a técnica de descontaminação de Petroff e a semeadura em meio de LJ parece ser a mais usada e difundida em todo o mundo, além de recomendadas por órgãos internacionais e pelo Ministério da Saúde em nosso País, partiu-se em uma primeira etapa para comparar os resultados obtidos por este processo, codificado como PLJ com os resultados obtidos pela técnica de descontaminação de amostra simplificada descrita por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) semeada em meio de Ogawa modificado, codificado como KOK.

Estabeleceram-se relações entre resultados positivos e não positivos de culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Na Tabela 3 observa-se a comparação entre 503 amostras, independente do objetivo da análise. Verifica-se a ocorrência de resultados positivos para ambas as técnicas em 26 (5,2%) amostras, 6 (1,2%) positivos em PLJ e não positivos em KOK, 10 (2,0%) positivos em KOK e não positivos em PLJ e 461 (91,6%) amostras com resultados negativos para as duas técnicas.

As 503 amostras estão relacionadas de maneira diferente na Tabela 8, de modo a permitir estudos de concordância. Verifica-se que a proporção

observada foi 96,8%, a esperada 87,4% e a concordância de Kappa 74,7%, considerada boa.

Observando-se as Tabelas 3 e 8 verifica-se que o número de 36 amostras positivas para KOK é 12,5% maior que as 32 amostras positivas em PLJ, mostrando que a técnica simplificada em estudo permitiu maior número de amostras positivas para o bacilo da tuberculose.

Na Tabela 4 observa-se que a positividade para micobactérias foi semelhante entre as duas técnicas, embora o número de 7 (1,5%) amostras positivas em KOK e não positivas em PLJ tenha sido superior ao inverso, 3 (0,7%) positivas em PLJ e não positivas em KOK. Isto em se tratando de 461 amostras recebidas para diagnóstico, das quais 427 (92,6%) foram não positivas por ambas as técnicas.

Os resultados obtidos com as 461 amostras recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar foram agrupados e apresentados também conforme Tabela 9, com o objetivo de calcular o grau de concordância entre as técnicas de cultura PLJ e KOK. Observa-se que a proporção observada de concordância é igual a 97,8%, a proporção esperada é 88,2% e a concordância de Kappa equivale a 81,6%, levando-se em consideração resultados positivos e não positivo e considerando-se a técnica de Petroff (PLJ) como padrão. O valor de 81,6% classifica a concordância de Kappa como ótima.

No entanto, observando-se as Tabelas 4 e 9, sete amostras (1,5%) foram não positivas pela técnica PLJ e positivas por KOK contra apenas três (0,7%) não positivas em KOK e positivas em PLJ. Isto mostra que a técnica de descontaminação e cultura KOK permitiu maior descoberta de casos positivos que a técnica PLJ considerada padrão. Somando o total de amostras positivas em KOK (31) e positivas em PLJ (27), tem-se quatro amostras (14,8%) a mais positivas pela técnica KOK.

As 42 amostras recebidas para controle de tratamento, nas quais o crescimento de micobactérias é mais difícil tendo em vista que os pacientes receberam quimioterapia e os microrganismos mesmo presentes na baciloscopia podem estar sem viabilidade de crescimento, também foram analisadas, embora a prioridade fosse amostras para diagnóstico (Tabela 5).

As 42 amostras de pacientes recebidas para controle de tratamento também foram agrupadas de maneira diferente da Tabela 5 e obteve-se a Tabela 10 que permite a estimativa do grau de concordância entre as técnicas de cultura PLJ e KOK. Com proporção observada de concordância igual a 85,7% e proporção esperada de 79,0% a concordância de Kappa ficou em 31,9%. Neste caso a concordância de Kappa é classificada como sofrível e sabe-se que a técnica de cultura não é adequada para pacientes em controle de tratamento.

Entretanto, observando-se as Tabelas 5 e 10 verifica-se que o número de amostras não positivas em KOK e positivas em PLJ é igual ao inverso, mostrando que as duas técnicas tiveram comportamento semelhante diante de amostras de pacientes em controle de tratamento.

Para MITCHISON⁸³ (1974) a técnica do swab é menos sensível porém mais simples e não usa centrifugação.

Pelos dados analisados constantes das Tabelas 3, 4, 5, 8, 9 e 10 verifica-se que os resultados obtidos nesse experimento são compatíveis com os resultados apresentados por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) e por OROZCO e cols.⁹⁶ (1985), reforçando a idéia de que a técnica simplificada KOK pode substituir PLJ sem prejuízos para a busca de casos nos programas de controle da tuberculose em nosso País e outras regiões e países em desenvolvimento. Conclusões semelhantes foram obtidas por SUSEMIHL e cols.¹²⁸ (1993).

Na Tabela 6 relacionam-se resultados positivos, negativos e contaminados das 503 amostras de escarro estudadas, recebidas para

diagnóstico e controle de tratamento de pacientes; verifica-se que apenas 4 (0,8%) amostras foram contaminadas totalmente em ambas técnicas de cultura, 4(0,8%) contaminadas em PLJ e positivas em KOK, 19 (3,8%) negativas em PLJ e contaminadas em KOK e 26 (5,2%) contaminadas em PLJ e negativas em KOK. Observa-se uma maior contaminação total dos meios de cultura semeados pela técnica PLJ comparado à técnica KOK.

Prosseguindo com a análise dos dados obtidos relacionou-se apenas resultados efetivamente positivos(P) e negativos (N) obtidos com culturas de escarro executadas pelas técnicas PLJ e KOK, eliminando-se os contaminados.

Agrupando-se todas as amostras com resultados apenas positivos ou negativos, independente do objetivo da cultura verifica-se na Tabela 11 que das 450 amostras sem resultados contaminados por qualquer uma das técnicas 26 (5,8%) concordam com resultados positivos para as duas técnicas de cultura (Figuras 3 e 4) 412 (91,6%) têm resultados negativos concordantes, 6 são negativas para PLJ e positivas para KOK e 6 positivas para PLJ e negativas para KOK. A proporção de concordância observada foi 97,3%, a esperada 86,8% e a concordância de Kappa 79,8%, classificada como boa e bem próximo ao ótimo..

Verifica-se na Tabela 12 que das 416 amostras sem contaminação recebidas para diagnóstico, 24 que corresponde a 5,8% do total apresentaram resultados positivos em ambas as técnicas (Figuras 3 e 4), 5 (1,2%) positiva em KOK e negativa em PLJ, 3 (0,7%) negativa em KOK e positiva em PLJ e 384 (92,3%) negativas nas duas técnicas. Observa-se novamente que o numero de amostras positivas por KOK que é de 29 ainda foi 7,4% superior às 27 positivas em PLJ. A proporção observada de concordância foi 98,1%, a esperada 87,4% e a concordância de Kappa igual a 84,6%, classificada como ótima neste caso.

Figura 3 - Culturas de escarro positivas pelas técnicas PLJ e KOK.

Figura 4 - Culturas de escarro positivas pelas técnicas PLJ e KOK.

Os resultados obtidos com as amostras recebidas para controle de pacientes em tratamento, em número de 34 após eliminação daquelas com contaminação presente por uma das técnicas, permite verificar resultados concordante negativo em 28 (82,3%) concordante positivo em 2 (5,9%) e discordante em 3 (8,8%) positivas em PLJ e negativas em KOK e apenas 1 (2,9%) negativa em PLJ e positiva em KOK (Tabela 13). Neste caso, o número de 5 amostras positivas em PLJ é 66,6% maior que as 3 positivas em KOK. A proporção de concordância observada é 88,2%, a esperada é 79,1% e a concordância de Kappa fica bem baixa em 43,7%, classificada como regular. Vale salientar, mais uma vez, que a cultura não é recomendada em pacientes já tratados pois a quimioterapia inviabiliza o crescimento do BK no meio de cultura, principalmente depois de período longo de tratamento, muito embora o paciente continue eliminando bacilos que podem ser detectados pelo exame microscópico.

Um quadro geral mais detalhado é apresentado na Tabela 15 na qual são relacionados resultados positivos, negativos e contaminados nas 503 amostras utilizadas para diagnóstico e controle de tratamento de pacientes, cultivadas pelas técnicas PLJ e KOK. Os resultados das culturas concordaram em 26 amostras positivas, 412 negativas e 4 contaminadas. Observa-se que quatro amostras positivas em KOK foram contaminadas em PLJ e nenhuma positiva em PLJ foi contaminada em KOK; 26 amostras negativas em KOK estavam totalmente contaminadas em PLJ contra 19 em situação inversa. Neste caso a proporção observada de concordância foi 87,9%, a esperada 77,5% e a concordância de Kappa 46,2%, classificada como regular. Neste caso observa-se que o número de 34 amostras contaminadas em PLJ é 47,8% maior que o de 23 amostras contaminadas em KOK.

Utilizando-se apenas amostras recebidas de pacientes para diagnóstico tem-se na Tabela 16 a relação entre resultados positivos, negativos e contaminados; da mesma forma, a Tabela 17 relaciona os resultados obtidos em amostras recebidas para controle de tratamento.

Na Tabela 16 a proporção observada de concordância é 89,2%, a esperada é 79,0% e a concordância de Kappa é 48,4% (regular) para amostras recebidas para diagnóstico. Nas amostras recebidas para controle de tratamento (Tabela 17) a proporção observada de concordância é 73,8%, a esperada é 62,4% e a concordância de Kappa apenas 30,3%, classificada como sofrível. Como o número de amostras contaminadas em PLJ foi maior que em KOK, observa-se que a concordância de Kappa apresenta resultados desfavoráveis quando se inclui as amostras contaminadas nas tabelas.

A observação dos dados obtidos apenas com as amostras de escarro recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar, representa de maneira mais apurada a realidade do objetivo de utilização da cultura, tendo em vista que a utilização de medicamentos pelos pacientes em tratamento inviabiliza ou reduz o potencial de crescimento e multiplicação do *M. tuberculosis* nos meios de cultura.

Sendo assim, as Tabelas 9 e 12 apresentam um quadro comparativo mais aproximado das duas técnicas de cultura empregadas com a concordância de Kappa igual a 81,6% e 84,6% respectivamente, ou seja, mais de 80% de resultados concordantes classificados como ótimos. Os números de amostras positivas em KOK e negativas em PLJ também são maiores que o inverso.

As tabelas também permitem observar percentagens elevadas de resultados concordantes e as proporções observadas e esperadas de concordância são, na grande maioria das vezes, bastante altas.

SUSEMIHL e cols.¹²⁸ (1993) avaliaram o método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias e concluíram que pode ser utilizado na rotina de diagnóstico bacteriológico em nosso País. Comparado com a técnica de Petroff os autores encontraram 96,0% de concordância bruta, 55,6% de concordância esperada e 91,0% de concordância ajustada de Kappa, não levando em consideração amostras contaminadas por um ou ambos os métodos.

SUSEMIHL e cols.¹²⁸ (1993) encontraram 34,0% das amostras positivas em PLJ e 32,1% positivas em KOK, o que representa 5,9% de positividade a mais para PLJ. Nesta pesquisa as 36 (7,16%) amostras positivas em KOK propiciaram 12,5% de positividade maior que as 32 (6,36%) positivas em PLJ.

Verificando-se a sensibilidade (S) e especificidade (E) da técnica KOK em relação ao PLJ, levou-se em consideração para avaliação apenas as Tabelas 9 e 12, por conterem dados referentes a amostras recebidas para diagnóstico. Encontrou-se na Tabela 9 sensibilidade de 88,9% e especificidade de 98,4%, incluídas amostras contaminadas como não positivas.

Na Tabela 12, retirou-se os resultados contaminados e considerou-se amostras positivas e efetivamente negativas, resultando na sensibilidade de 88,9% e especificidade de 98,7%.

É possível que a sensibilidade da técnica de Ogawa-Kudoh seja eventualmente afetada pela não utilização do processo de concentração de bacilos por centrifugação¹²⁸ apesar de outros autores afirmarem que este processo altera ou reduz a viabilidade do BK.

Ainda de acordo com SUSEMIHL e cols.¹²⁸ (1993), a conclusão diagnóstica obtida com a técnica de Ogawa-Kudoh, grau elevado de concordância e a taxa de contaminação semelhante ao Petroff, tornam a técnica exequível na rotina de laboratórios.

Os resultados obtidos pelos autores citados acima são semelhantes aos obtidos nesta pesquisa, muito embora a disponibilidade de amostras positivas tenha sido bem menor, o que pode ter gerado a diferença estatística na concordância de Kappa, apesar da semelhança maior na concordância bruta. Verifica-se que a concordância de Kappa foi classificada como ótima pelos dados das Tabelas 9 e 12 deste trabalho, mesma classificação obtida pelos resultados de SUSEMIHL e cols.¹²⁸ (1993) apesar da diferença dos valores encontrados.

A contaminação das culturas de escarro é fator preponderante para alteração de resultados e deve ser levada em consideração de forma tal que cuidados sejam tomados para reduzir ao mínimo possível a proporção de culturas contaminadas.

Considerou-se resultado contaminado quando os dois tubos de meio de cultura semeados pela técnica PLJ ou os dois semeados pela técnica KOK apresentavam-se contaminados de maneira a não permitir o desenvolvimento de micobactérias e/ou sua leitura (Tabelas 6 e 15).

A contaminação alcalinizante torna o meio amarelado, contaminação acidificante intensifica a cor verde e o meio se liquefaz quando a contaminação é decorrente da presença de germes proteolíticos^{2,94}.

Nas Tabelas 7 e 14 relacionaram-se resultados contaminados com não contaminados, independentemente de serem positivos ou negativos; verificou-se que 450 amostras, 89,4% do total, não apresentavam contaminação que prejudicasse a cultura, 4 (0,8%) foram totalmente contaminadas em ambas as técnicas, 30 (6,0%) contaminadas em PLJ e não contaminadas em KOK e 19 (3,8%) não contaminadas em PLJ e contaminadas em KOK. Observa-se nas duas Tabelas que o número de amostras contaminadas em PLJ (34) é 47,8% maior que as 23 contaminadas em KOK.

Os dados da Tabela 14 permitem verificar que a proporção de concordância observada é 90,3%, a esperada é 89,2% e a concordância de Kappa é 9,3%. Esta concordância classificada como fraca se deve ao grande número de amostras contaminadas em PLJ, 47,8% maior que em KOK. Por outro lado, os resultados de concordância obtidos a partir de amostras com resultados positivos e não positivos obtidos nas Tabelas 8 e 9 ou apenas positivas e negativas citados nas Tabelas 11 e 12, permite verificar que a concordância ajustada de Kappa alcança valores classificados como bom e ótimo.

KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) comparando a técnica de cultura original de Ogawa com a técnica de **swab** da OMS e meio de LJ encontraram 1% a 9,8% das amostras, respectivamente, totalmente contaminadas tornando impossível a leitura ou crescimento de micobactérias.

Comparando o método de **swab** da OMS com a técnica de descontaminação que desenvolveram semeadas em meio de Ogawa, KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974), encontraram contaminação parcial em, respectivamente 40,8% e 11,7% e contaminação total em 1,7% das amostras para ambas as técnicas.

Ainda KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) compararam a técnica de cultura com **swab** da OMS (meio LJ) com a técnica de cultura que desenvolveram usando o meio Ogawa modificado. Os resultados mostraram contaminação parcial em 4,5% e 5,5% das amostras, respectivamente e contaminação total em 1,0% e 0,7%.

OROZCO, e cols.⁹⁶ (1985) compararam os resultados de análises simultâneas de amostras de escarro descontaminadas pela técnica de Petroff e semeadas em meio LJ e descontaminadas pela técnica de Kudoh & Kudoh semeada em meio de Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh (OK). Os autores

estudaram duas séries de amostras, na primeira série com 150 amostras encontraram 6 (4%) contaminadas em PLJ e 12 (8%) em KOK, ou seja duas vezes mais; na segunda série com 180 amostra a contaminação ocorreu em 11 (6,1%) amostras cultivadas em PLJ e 16 (8,8%) em KOK, ou seja, 44,3% a mais.

SUSEMIHL e cols.¹²⁸ (1993) encontraram 4,73% de amostras contaminadas pela técnica de descontaminação de Petroff e semeadura em meio de Lowenstein-Jensen e 4,14% de contaminação pela técnica de Kudoh & Kudoh em meio de Ogawa modificado. A contaminação em KOK é semelhante ao valor encontrado nesta pesquisa (4,6%) mas para PLJ os valores estão bem abaixo dos 6,8% encontrados.

Os níveis de contaminação maiores para KOK encontrados por OROZCO e cols.⁹⁶ (1985) diferem dos níveis de contaminação total encontrados nesta pesquisa onde a contaminação em PLJ é maior que KOK (Tabelas 6 e 15); é provável que a menor concentração (3%) de hidróxido de sódio que utilizou-se como originalmente preconizado por PETROFF¹⁰¹ (1915) tenha contribuído para isto.

SUSEMIHL e cols.¹²⁸ (1993) também compararam as duas técnicas de cultura e encontraram contaminação total em 4,3% das amostras processadas pela técnica PLJ, menor que os 6,8% encontrados nesta pesquisa; para KOK os autores encontraram contaminação em 4,14% das amostras, semelhante aos 4,6% desta pesquisa.

Outras pesquisas também fazem referências aos níveis de contaminação encontrados nas diversas técnicas de cultura utilizadas para diagnóstico de tuberculose, grande parte delas tomando como base o meio de cultura de Lowenstein-Jensen.

WAISBICH & BARROS¹³⁴ (1967) compararam o meio de cultura de Lowenstein-Jensen com o mesmo meio adicionado de ácido ribonucleico (RNA) e encontraram diferenças estatisticamente insignificantes de contaminação.

WAISBICH e cols.¹³⁵ (1971) compararam o meio de Lowenstein-Jensen (LJ) com o meio de cultura da "American Trudeau Society" (ATS) e concluíram que, apesar de apresentar melhores níveis de positividade o meio LJ apresenta índice de contaminação levemente mais alto.

Para GONTIJO FILHO & NASCIMENTO⁴¹ (1973) os meios sintéticos não apresentam superioridade no que se refere a menor contaminação quando comparados ao meio de Lowenstein-Jensen.

MITCHISON⁸³ (1974) afirmou que os índices elevados de contaminação são comuns nos laboratórios de regiões tropicais. A adição de benzil-penicilina no meio de cultura reduz a contaminação e não inibe o crescimento do bacilo da tuberculose. Uma das principais razões para tornar o meio não satisfatório é o uso de verde malaquita como inibidor do crescimento da microbiota associada.

ENGEL & SEKHUIS²⁹ (1977) estudaram quatro técnicas de descontaminação de escarro e concluíram que o lauril-sulfato de sódio permite o menor índice de contaminação e o N-acetil-L-cisteína maior contaminação; a utilização do hidróxido de sódio e do ácido sulfúrico apresenta resultados intermediários no que se refere à contaminação.

RADHAKRISHNA e cols.¹⁰⁹ (1980) realizaram estudo matemático da contaminação em culturas de bacilo da tuberculose. Compararam culturas de escarro feitas com meio de Lowenstein-Jensen executadas logo após a coleta com culturas provenientes de amostras colhidas durante a noite anterior. Comprovaram que as amostras recolhidas durante a noite tinham índices de contaminação (4,5% a 10,2%) bem maiores que as amostras analisadas logo

após a coleta (1,3 a 4,0%). Os autores consideraram as culturas contaminadas quando os dois tubos mostraram contaminação e não havia evidência do crescimento de bacilo da tuberculose.

SATHIANATHAN & KHALIL¹²¹ (1981) compararam o método de descontaminação e cultura padrão da UICTER com um método de descontaminação e cultura por swab e encontraram diferenças significantes nos níveis de contaminação parcial e total das culturas; 4% das amostras testadas pelo método padrão e 1,2% pela técnica simplificada foram contaminados nos dois tubos.

SHAH e cols.¹²³ (1985) compararam o método radiométrico com a cultura tradicional em meio de Lowenstein-Jensen e encontraram 2,4% das amostras contaminadas pelo método radiométrico contra 8,3% das amostras contaminadas em meio LJ.

ARANTES & TRIVELLATO⁷ (1986) estudaram a contaminação de escaros de sintomáticos respiratórios por micobactérias atípicas e acharam que isto pode ser consequência de contaminação por poeiras de ambiente durante a manipulação ou contaminação de reativos ou do próprio meio de cultura.

RATNAN e cols..¹¹⁰ (1987) compararam o cultivo de amostras não descontaminadas e amostras descontaminadas usando meios seletivos e descobriram níveis de contaminação muito elevados nas amostras não submetidas à descontaminação, mostrando que este processo é essencial para cultura de amostras de escarro. Estudaram também a redução do hidróxido de sódio no procedimento de descontaminação com N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio e uma simplificação desta técnica, concluindo que ela pode ser usada sem aumento nos índices de contaminação.

Em termos de contaminação a técnica simplificada descrita por VASANTHAKUMARI¹³³ (1990) apresentou 6,1% de contaminação contra

12,2% da técnica de Petroff, 6,8% contra 11,3% do método N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio, 5,9% contra 12,1% da técnica de cloreto de cetil-piridínio e 6,3% de contaminação contra 14,4% da técnica de swab de Nassau. Esta técnica simplificada apresentou níveis de contaminação menores que as quatro técnicas de descontaminação com as quais foi comparada.

HOFFNER e cols..⁴⁴ (1992) encontraram índices baixos (2,2%) de contaminação no sistema MB CHECK comparado a 5,2% do sistema radiométrico Bactec e 7,7% no meio de Lowenstein-Jensen. As amostras foram descontaminadas pelo método do lauril-sulfato de sódio.

O sistema septi-CHECK AFB usado para isolamento de micobactérias apresentou índice de contaminação de 2,9% contra 4% do Bactec e 6,6% no meio de Lowenstein-Jensen, em estudo realizado por WHITTIER e cols..¹³⁸ (1992) para avaliação do sistema Septi-Check AFB usado na descoberta de micobactérias.

ICHIYAMA e cols..⁴⁹ (1993) compararam o sistema MB CHECK para cultura bifásica com um meio sólido contendo ovo normalmente usado no Japão, meio de Ogawa. Os índices de contaminação de amostras analisadas pelo sistema MB CHECK foi de 11,5% bem maior que os 3,9% encontrados no meio de Ogawa.

Para ANDRADE² (1970) é normal a observação de tubos contaminados por outras bactérias ou fungos, em decorrência de falhas no processo de descontaminação ou existência de microrganismos resistentes ao agente descontaminante.

Neste experimento os percentuais de culturas contaminadas executadas pelas técnicas PLJ (6,8%) e KOK (4,6%) são compatíveis com os resultados obtidos em outras pesquisas citadas; deve-se levar em consideração que os trabalhos foram desenvolvidos em um laboratório básico de saúde pública,

como era desejado, sem área destinada especificamente para micobactérias, o que poderia reduzir essa contaminação.

Para os programas de Saúde Pública os custos financeiros dos procedimentos são de importância fundamental para a escolha dos instrumentos mais adequados e recomendados para a região onde a atividade vai ser implantada.

Sendo assim, fez-se uma estimativa de custos dos produtos utilizados para o diagnóstico e tuberculose pulmonar em amostras de escarros descontaminadas pela técnica de Petroff e semeadas em meio de Lowenstein-Jensen e pela técnica de Kudoh & Kudoh semeadas em meio de Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh.

Na Tabela 18 relacionou-se a quantidade de cada produto utilizado na elaboração dos meios de cultura de Lowenstein-Jensen (LJ) e Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh (OK) com os custos em reais, obtidos de acordo com os preços de mercado. Utilizaram-se quantidades dos produtos para a preparação de cinco vezes a fórmula básica de cada meio, suficiente para a obtenção de 80 tubos de cada meio de cultura.

Dividindo-se os valores apurados para o meio LJ (R\$ 21,60) e OK (R\$ 6,75), constantes da Tabela 18, por 80 encontra-se um valor de R\$ 0,27 (vinte e sete centavos de real) para cada tubo de meio LJ e R\$ 0,08 (oito centavos de real) para cada tubo de meio OK, dando um custo de R\$ 0,54 (cinquenta e quatro centavos de real) para os meios de cultura na técnica PLJ e R\$ 0,16 (dezesseis centavos de real) na técnica KOK, considerando-se que a semeadura foi feita em duplicata.

Verifica-se pelos valores citados que o meio de cultura de Lowenstein-Jensen é cerca de 3,3 vezes mais caro que o meio de Ogawa modificado por

Kudoh & Kudoh e que a asparagina representa cerca de 77,7% do custo total do meio LJ (Tabela 18).

Para SUSEMIHL e cols.¹²⁸ (1993) o meio de Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh é mais econômico que o meio de Lowenstein-Jensen, principalmente por não utilizar asparagina.

Na Tabela 19 relacionou-se a quantidade e custo de cada produto utilizado nos processo de descontaminação de amostras de escarro descritos por Petroff e Kudoh & Kudoh. Verifica-se que para descontaminar 100 amostras de escarro pela técnica de Petroff o custo do material é de R\$ 0,68 (sessenta e oito centavos de real) e de R\$ 2,82 (dois reais e oitenta e dois centavos) para a técnica de Kudoh & Kudoh.

Verifica-se na Tabela 19 que grande parte do custo elevado no processo de descontaminação pela técnica de Kudoh & Kudoh, se deve a haste de madeira do swab; entretanto várias alternativas podem ser usadas para reduzir acentuadamente este custo, citando-se como exemplo de alternativa a utilização do talo da folha de coqueiro no Nordeste do Brasil ou palitos de bambu que podem ser preparados no laboratório. Outro ponto importante é a solução de hidróxido de sódio cujo volume pode ser reduzido para cerca de 4mL na técnica KOK além da concentração menor (3,0%) usada na técnica PLJ diferente dos 4,0% recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Além do custo dos produtos usados pelas duas técnicas de descontaminação e cultura, outra vantagem da técnica descrita por Kudoh & Kudoh (KOK) é não necessitar de centrífuga e agitador.

Estudo realizado por VASANTHAKUMARI¹³³ (1990) levou o autor a concluir que o método de swab de Nassau para cultura de escarro é ideal para laboratórios de países em desenvolvimento e que não tem centrífuga, porém os índices de isolamento são baixos e o método não é satisfatório para a cultura de

amostras de escarro negativas ao exame direto; por outro lado, o índice de contaminação é elevado. Entretanto, na presente pesquisa encontrou-se resultados mais favoráveis para a técnica do swab descrita por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974).

Percebe-se pelas Tabelas 18 e 19 que a técnica descrita por Kudoh & Kudoh tem custo menor em termos de produtos utilizados, somando meio de cultura com o processo de descontaminação, sem considerar o gasto com energia elétrica, desgaste e manutenção dos aparelhos, o que encarece ainda mais a técnica PLJ.

Verifica-se que além do custo menor com material a técnica KOK é realizada sem utilização de meios mecânicos (centrífuga e agitador) que consomem energia elétrica, podendo ser executada em locais distantes, sem energia elétrica, para posterior remessa e acompanhamento das culturas em laboratórios maiores, o que não ocorre com a técnica PLJ.

Outro aspecto importante a ser considerado está relacionado ao tempo gasto por cada processo de descontaminação. Pelo processo de Kudoh & Kudoh é possível concluir que, desde a tomada da amostra no recipiente de coleta, passando pelo processo de descontaminação (com o máximo de 2 minutos para permanência do **swab** na solução de hidróxido de sódio) até a sementeira na superfície do meio sólido, o tempo total não irá ultrapassar 3 minutos por amostra. Considerando que é possível a execução concomitante de descontaminação de duas amostras, na prática pode-se prever um tempo médio de menos de dois minutos por amostra.

Pelo processo de descontaminação de Petroff, são necessários 30 minutos de agitação em temperatura ambiente, 15 minutos de centrifugação e 5 minutos de repouso da amostra, totalizando 50 minutos sem levar em conta o tempo gasto com a neutralização e todas as outras tarefas, inclusive para o equilíbrio

do rotor da centrífuga. Se o volume de amostra é grande este tempo poderá ser diluído utilizando-se uma centrífuga com capacidade para 16 tubos, só que se deve levar em conta que o tempo necessário para o processo de descontaminação/neutralização de cada amostra também deve ser multiplicado pelo número de amostras. A experiência demonstra que, diante de toda a complexidade do processo, o tempo médio gasto para a descontaminação de amostras de escarro pela técnica de Petroff é, pelo menos, quatro vezes maior que pela técnica de **swab** descrita por Kudoh & Kudoh. Se o processo fosse executado amostra por amostra a técnica PLJ demoraria, no mínimo, 25 vezes mais tempo que a técnica KOK.

Outra desvantagem do processo de Petroff está relacionado ao tempo maior que o laboratorista passa manipulando a amostra, o risco de rompimento ou abertura dos tubos na centrífuga e a transferência do conteúdo do copo plástico de coleta da amostra para o tubo de ensaio, com maior risco de contaminação do manipulador e do ambiente.

A segurança é um aspecto fundamental em laboratório de micobacteriologia pois o longo período de incubação na tuberculose e a exposição ao BK também fora do laboratório dificulta identificar se a infecção está ou não associada ao trabalho. Estudos demonstraram que técnicos de laboratório têm risco cinco vezes maior de contrair tuberculose que os membros da comunidade⁸².

O bacilo da tuberculose é classificado pela OMS no grupo III entre os microrganismos transmitidos por via aerógena, o que implica na adoção de medidas que previnam a inalação de aerossóis além da ingestão ou inoculação acidental durante os procedimentos de laboratório, necessitando de áreas apropriadas e restritas para esta atividade⁸².

Muitas técnicas utilizadas na rotina dos laboratórios de micobacteriologia produzem aerossóis que podem conter bacilos, como resultado da agitação de amostras e suspensões bacterianas, quebras de tubos durante a centrifugação e da transferência de amostras, culturas em meios líquidos e fluidos sobrenadantes⁸².

A técnica de descontaminação de Petroff^{80,82,101,102}, utiliza procedimentos que favorecem a formação de aerossóis; por outro lado, a técnica simplificada em estudo descrita por Kudoh & Kudoh⁶⁸ não utiliza processos de agitação e centrifugação ou transferência de suspensões de bactérias, o que reduz sensivelmente o risco de produção de aerossóis, com menor risco de contaminação ambiental e maior segurança para o pessoal do laboratório, permitindo inclusive que amostras sejam processadas em laboratórios mais simples.

Realizou-se experimento (não publicado) para descontaminação e semeadura de amostras de escarro em área distante e posterior transporte da cultura para incubação e acompanhamento no LHS-FCFA-UNESP. Amostras de escarro de índios da tribo Ofayé do Mato Grosso do Sul foram coletadas e posteriormente descontaminadas e semeadas pela técnica do **swab** descrita por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974). O processo foi executado em uma área improvisada, sem energia elétrica e utilizando-se uma lâmpada a álcool em lugar do bico de gás. Após permanecer em temperatura ambiente as culturas foram incubadas e acompanhadas por 60 dias, mas não se encontrou resultados positivos para micobactérias. Entretanto, a opinião dos laboratoristas que executaram o trabalho é que a técnica é bem mais simples e rápida que os processos convencionais de descontaminação empregados nas rotinas dos laboratórios.

Nesta pesquisa realizou-se um segundo experimento para testar a viabilidade do bacilo da tuberculose em amostras descontaminadas e semeadas pela técnica de **swab** descrita por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974), cujas culturas foram acondicionadas em caixa de isopor e mantidas à temperatura ambiente por até 120 horas no porta-malas de um veículo para simulação do transporte (Figura 2).

As amostras submetidas ao teste de viabilidade do BK e simulação do transporte estão relacionadas na Tabela 20 e no Quadro I (Anexo 5). Verifica-se que das 43 amostras utilizadas no experimento 7 (16,3%) foram recebidas para controle de tratamento e 36 (83,7%) para diagnóstico de tuberculose pulmonar. Os resultados das culturas incubadas imediatamente e de 24 horas até 120 horas após semeadura, estão relacionados aos resultados da baciloscopia realizada pelo SESA e ao tempo decorrido entre o recebimento da amostra e o início do processo de análise.

Das sete amostras de pacientes em controle de tratamento duas apresentaram resultados positivos para todas as culturas incubadas imediatamente e até 120 horas após semeadura e simulação do transporte; uma amostra teve todas as culturas incubadas até 48 horas após semeadura positivas para micobactérias. Duas amostras tiveram todas as culturas negativas independente da demora para incubação em estufa e as duas restantes apresentaram contaminação alcalinizante em todos os tubos de cultura (Quadro I do Anexo 5).

Entre as 36 amostras de pacientes recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar 15 tiveram culturas semeadas até 120 horas, positivas para micobactérias (Figura 5). Observa-se que o número de culturas com resultados positivos é maior à medida que diminui o tempo decorrido entre a semeadura da amostra e a incubação do tubo na estufa, ou seja, tempo de duração do transporte da amostra. Dez amostras tiveram todos os tubos com culturas negativas ou contaminadas (Quadro I do Anexo 5).

Figura 5 - Amostras com culturas positivas incubadas até 120 horas após semeadura e transporte.

Das amostras recebidas para diagnóstico 11 tiveram alguma cultura contaminada. Considerando-se o número total de tubos de cultura ($36 \times 7 = 252$) verifica-se que apenas 14 (5,6%) apresentaram contaminação (Quadro I do Anexo 5).

Observa-se ainda um número bastante significativo de amostras de pacientes recebidas para diagnóstico que apresentaram resultados negativos para as culturas executadas pela técnica KOK, independente do período decorrido entre a semeadura e a incubação (tempo de transporte) e das contagens de bacilos obtidos na baciloscopia. Algumas variáveis que podem ter contribuído para este fato inesperado serão discutidas na sequência.

A presença de amostras de escarro recebidas para diagnóstico positivas ao exame direto e negativas para cultura pode ser consequência da utilização de meios de cultura estocadas por tempo superior ao recomendado. Isto pode ter ocorrido pela escassez de amostras positivas cuja frequência não era programável o que não permitia a programação de elaboração do meio de cultura fazendo com que algumas amostras ao serem recebidas tenham sido cultivadas em meios não recentes.

Para FODOR & SZABO³¹ (1973) o preparo e conservação do meio de cultura é fundamental para a bacteriologia da tuberculose. Diferenças que ocorrem nos meios de cultura decorrem de acidentes ou pela qualidade diversa dos ovos utilizados que não são padronizados.

Atribuir esta negatividade a outros fatores como maior ou menor concentração de bacilos por mL de amostras registrado no resultado do exame direto, tempo decorrido até o início da análise ou variação maior de temperatura durante a simulação do transporte, não nos parece sustentável pois a observação atenta do Quadro I (Anexo 5) não permite nenhuma avaliação conclusiva.

Sabe-se que conservação e transporte de amostras de materiais biológicos sem alterações comprometedoras para os resultados das análises⁴⁷, tem sido

objeto de várias pesquisas em todo o mundo, inclusive com amostras de escarro para diagnóstico de tuberculose pulmonar, principalmente quando da implantação de sistemas de laboratórios de Saúde Pública cuja racionalização preconiza sua organização em níveis de complexidade técnica variada, onde a coleta de amostras nos níveis mais baixos e sua remessa para análise mais complexas nos níveis superiores tornou cada vez mais importante e necessária a estocagem adequada e o transporte eficiente e seguro destes materiais.

No que se refere ao *Mycobacterium tuberculosis* e à preservação da sua viabilidade para crescimento em culturas após transporte, bem como estocagem de amostras de exame e remessa de esfregaços, entre outros, alguns trabalhos de pesquisa foram realizados.

LATINI & LATINI⁶⁹ (1985) consideraram que a cultura deveria ser incorporada como técnica mais sensível e específica para diagnóstico e outras atividades e estudos de micobactéria. Afirmaram que o exame direto podia ser realizado em serviço de saúde com recursos limitados e a cultura teria o inconveniente de requerer elementos de complexidade média, geralmente escassos. Para os autores, a alternativa para estas inconveniências seria desenvolver redes de laboratórios com facilidades para transporte de amostras e execução de culturas em alguns centros mais capacitados ou desenvolver técnicas de cultura simplificadas que possam ser aplicadas nas condições gerais dos serviços de saúde.

Sabe-se que as temperaturas baixas conservam a viabilidade dos bacilos álcool-ácidos-resistentes e que a morte se processa à medida que ela se eleva. Quando se trata de bacilo humano, o seu crescimento cessa abaixo de 30°C e acima de 42°C³.

No escarro, o BK sobrevive por três meses em temperatura de 22°C e por apenas 4 dias à 37°C, confirmando ser impossível a remessa de amostras de

escarro "in natura" de locais distantes para realização de cultura. As temperaturas baixas preservam a viabilidade do bacilo por períodos de 6 até 14 meses³.

Se o escarro não vai ser examinado no mesmo dia ou deve ser transportado para análise em laboratórios distantes, medidas de proteção devem ser tomadas contra o calor excessivo e a luz, devendo ser mantido sob refrigeração no local de coleta até o exame ou transporte³.

Quando a amostra de escarro é proveniente de áreas onde não existem condições de análise da amostra ou conservação em baixa temperatura, a opção é purificar e semear no local, utilizando técnica simplificada e que não necessite aparelhagem especial³.

ENGBAEK & BENTZON²⁸ (1964) realizaram experimentos com amostras de escarro frescas, com objetivos de examinar os efeitos do tempo e da temperatura sobre os resultados das culturas. Concluíram que a influência do tempo de remessa da amostra sobre o resultado da cultura depende muito da temperatura. Para os autores a estocagem em temperatura igual ou inferior a 4°C por mais de 4 semanas não tem efeito sobre a percentagem de contaminação ou isolamento e crescimento do bacilo da tuberculose. Em temperatura de 22°C o BK é prejudicado após duas semanas de estocagem, embora a deterioração comece a ocorrer na primeira semana.

ANDRADE & GUTMAN³ (1969) concordam com ENGBAEK & BENTZON²⁸ (1964) sobre a estocagem e transporte de amostras a 4°C; entretanto, lembram que em muitas áreas e países este procedimento não é possível e recomendam o uso de técnicas simplificadas de cultura onde a amostra é descontaminada e semeada no local, sendo remetidas para incubação, cultivo e identificação em laboratório mais complexo. Quando não se usa refrigeração, o clima influencia nos resultados, principalmente no

desenvolvimento de contaminantes, se a amostra não for descontaminada e semeada.

ANDRADE² (1970) afirma que o problema do transporte está muito relacionado ao da conservação da amostra, que visa impedir o desenvolvimento de organismos contaminantes e preservar a viabilidade das micobactérias. Como nem sempre é possível analisar a amostra no local de colheita, cuidados especiais devem ser tomados para não alterar a eficácia do exame. Para o autor o melhor meio de conservação é a refrigeração mas, quando não é possível usa-se técnica de purificação e semeadura da amostras no local de colheita, seguido de transporte ao abrigo da luz e temperaturas elevadas para posterior incubação em laboratórios.

Para MITCHISON⁸³ (1974) a estocagem de amostras de escarro em temperatura ambiente em regiões tropicais, não afeta os resultados do esfregaço direto por algumas semanas e tem pequeno efeito sobre a cultura se o período é menor que sete dias; em períodos acima de sete dias os índices de isolamento caem e os índices de contaminação aumentam.

Para KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) é evidente a necessidade de uma técnica de cultura simples e permanente que possa ser aplicável em laboratórios distantes e pobremente equipados, para remessa posterior e cultivo em laboratórios centrais. Se as amostras são coletadas e remetidas a laboratórios distantes, se o tempo de transporte for longo os resultados das culturas podem ser menos confiáveis ou seguros em consequência da deterioração do escarro. Várias pesquisas citadas pelos autores atribuem o aumento da contaminação de amostras de escarro ao período de duração da estocagem e aumento da temperatura.

Muitos descontaminantes têm sido estudados e propostos para prevenir a decomposição do escarro entretanto, se a contaminação vem a ser controlada

também pode vir a dificultar o crescimento do bacilo da tuberculose. A viabilidade do bacilo da tuberculose também pode ser afetada por estocagem prolongada e alta temperatura²⁸.

KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) relataram que a técnica simplificada para descontaminação e semeadura de amostras proposta e avaliada por eles serve perfeitamente para ser utilizada em áreas onde as condições de laboratório precárias indicam a necessidade de que as amostras sejam remetidas aos laboratórios centrais já semeadas em meios de cultura apropriado para incubação e acompanhamento por pessoal capacitado e em condições adequadas.

NIERO⁸⁸ (1977) afirmou que o escarro pode ser mantido em geladeira por até 7 dias sem que haja interferências na sua qualidade. Entretanto, recomendou a análise de amostras frescas principalmente para o desenvolvimento de micobactérias em meios de cultura.

IWASAKI & HIKAWA⁵³ (1979) estudaram a utilização de esfregaços de escarro não fixados para o transporte de amostras destinadas ao exame para busca de casos de tuberculose, por baciloscopia e cultura. Para os esfregaços mantidos em caixas de madeira à temperatura ambiente (15-25°C) por até 4 semanas, não houve alteração da capacidade de coloração do bacilo ao contrário das amostras mantidas a 37°C que tiveram leve redução. Para cultura, os esfregaços mantidos em temperatura de 22°C não apresentaram quase nenhuma redução no número de colônias enquanto esta redução foi considerável nos esfregaços utilizados para cultura e mantidos em temperatura de 37°C.

GIBBS³⁸ (1980) descreveu técnicas diversas para transporte de amostras microbiológicas em áreas tropicais. Para micobactérias sugeriu que a amostra fresca seja transportada em recipiente de plástico bem fechado e sem soluções descontaminantes, mantidas em gelo por até 24 horas. Para estocagem ou

transporte por período mais longo o escarro para cultivo deve ser misturado com volume de uma solução de cloreto de cetilpiridínio 1% - cloreto de sódio 2% em um recipiente de plástico pequeno e com tampa de rosca; a solução digere o escarro espesso, inibe o crescimento de outras bactérias e as micobactérias permanecem viáveis por até oito dias³⁸.

PARAMASIVAN cols.⁹⁸ (1983) estudaram os efeitos da estocagem de amostras de escarro em temperatura ambiente sobre os resultados do exame direto e da cultura. No primeiro estudo estocaram 41 amostras de escarro por até 28 dias e comprovaram não ter ocorrido alteração nos resultados do exame direto mas a positividade da cultura caiu de 88% antes da estocagem para 83%, 68%, 22%, 13% e 0% após, respectivamente, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem. No segundo estudo estocaram 163 amostras por 3, 5 ou 7 dias; cada amostra foi examinada antes e após dois períodos de estocagem e os autores não acharam variações nos resultados dos exames diretos mas ocorreu perda significativa da viabilidade do bacilo da tuberculose com a proporção de culturas positivas caindo de 93% antes da estocagem para 83%, 71% e 63% no 3º, 5º e 7º dia, com índices de contaminação de, respectivamente, 5%, 7%, 12% e 18%. Concluíram que amostras de escarro não podem ser estocadas por mais que três dias em temperatura ambiente para realização de cultura e por quatro semanas no caso de exame direto do esfregaço.

Para LATINI & LATINI⁶⁹ (1985) o inconveniente principal do transporte de amostras entre laboratórios da rede é a sua conservação, o momento da coleta e seu processamento; em regiões quentes a multiplicação de microrganismos saprófitas provoca uma contaminação elevada das culturas e perda da viabilidade do bacilo da tuberculose. Os autores estudaram a positividade para cultura de amostras de escarro conservadas em temperatura ambiente por uma semana, com e sem inibidores de contaminação, semeados em meio de cultura

de Lowenstein-Jensen com e sem antibiótico e compararam com a positividade à cultura das mesmas amostras semeadas imediatamente. Estes resultados foram comparados com os resultados da baciloscopia das amostras. Concluíram que a descontaminação e semeadura imediata das amostras é a melhor alternativa pois alcança melhor rendimento para cultura, já que a conservação em temperatura ambiente reduz a viabilidade do bacilo e aumenta a contaminação. Afirmaram que a utilização de solução de ácido bórico a 1,5% é a melhor alternativa para conservação de amostra de escarro pois inibe a microbiota associada e provoca danos reduzidos sobre o bacilo de tuberculose.

KANTOR & ISOLA⁵⁷ (1985) estudaram culturas de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de esfregaços de escarro não fixados, mantidos ao abrigo da luz em temperaturas de 4°C ou 20 a 25°C. Prepararam 7 esfregaços de cada uma das 102 amostras positivas ao exame direto; um dos esfregaços foi semeado imediatamente, 3 armazenados a 4°C e 3 a 20-25°C, com culturas realizadas após 4, 8 e 15 dias, sendo cada amostra inoculada em dois tubos com meio de Lowenstein-Jensen e dois de meio de Stonebrink. Consideraram que a percentagem de amostras originalmente positivas e que apresentaram resultados negativos para cultura por este método é muito alto e não aconselham a sua utilização, lembrando que a manipulação de esfregaços não fixados significa um risco de contaminação adicional para o pessoal do laboratório.

OROZCO e cols.⁹⁶ (1985) também estudaram a técnica de descontaminação e cultura proposta por Kudoh & Kudoh; lembram que segundo estes autores demonstraram, uma vez processado o escarro pela técnica descrita, pode permanecer em temperatura ambiente por várias semanas e ser remetido posteriormente a um laboratório que possua recursos para incubação, fato também observado por eles.

Para SUSEMIHL e cols.¹²⁸ (1993) o meio de Ogawa-Kudoh, após sementeira pela técnica de Kudoh & Kudoh, pode ser mantido à temperatura ambiente por até 20 dias, o que possibilita sua remessa de locais distantes para incubação em laboratório de nível superior na rede.

Nesta pesquisa, as doze amostras de pacientes para diagnóstico de tuberculose que tiveram os resultados das culturas negativos por problemas de estocagem dos meios, juntamente com a queda acentuada de positividade das demais já após 48 horas de permanência fora da estufa (Tabela 20; Quadro I do Anexo 5) prejudicaram o desenvolvimento do experimento e impediram conclusões definitivas. Entretanto as quinze amostras incubadas até 120 horas após sementeira que tiveram todas as culturas positivas mostram que o BK resiste ao transporte após processamento da amostra pela técnica KOK, conforme citações de outros autores, mas evidencia a necessidade de estudos controlados em condições diversas para ratificar a utilização do sistema de transporte proposto.

Parece evidente que as técnicas laboratoriais modernas não são aplicáveis nos países em desenvolvimento e, menos ainda, nas regiões mais distantes destes países; mesmo nos países desenvolvidos ainda existem restrições quanto ao emprego de técnicas como PCR, ELISA e métodos radiométricos.

Fica claro que os métodos bacteriológicos onde se visualiza o *Mycobacterium tuberculosis* ou o seu crescimento, ainda permanecerão como métodos de escolha para busca de casos, diagnóstico e controle de tratamento de pacientes, seguindo assim a conceituação de caso de tuberculose aceita em todo o mundo.

Estudos voltados para a melhoria dos técnicas bacteriológicas-exame direto do esfregaço e cultura - têm por objetivos elevar a capacidade de detecção do bacilo e/ou reduzir os custos e a complexidade das técnicas, de modo que

sejam empregadas de maneira ampla, mesmo em regiões com carência em termos de laboratório.

A implantação ou implementação de redes de laboratórios de análises com níveis diversos de complexidade, necessita de um sistema de transporte de amostra capaz de conservar e remeter o material em condições apropriadas, para que seja cultivada e acompanhada em centros mais capacitados⁴⁷.

Em nosso País a Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública para o Diagnóstico de Tuberculose faz parte do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública⁸².

Nas redes de laboratório deve ser levado em consideração a padronização da qualidade de todo o material usado no preparo de meios de cultura, vidraria e conservação dos meios distribuídos pelo laboratório central, que checa sua efetividade; a checagem dos procedimentos deve ser feita no laboratório local³¹.

Para o transporte de amostras de escarro é necessário manter sob refrigeração e ao abrigo da luz solar, tomando cuidado para não derramar, utilizando-se caixas com divisórias para acondicionamento dos potes. No caso de culturas, deve ser utilizado meio sólido inclinado⁸².

A remesa de amostra de escarro fresco mantida sob refrigeração parece bastante complicada e inviável, principalmente entre grandes distâncias. Em temperatura ambiente, com ou sem adição de descontaminante, ocorre maior perda de viabilidade do bacilo, reduzindo sua capacidade de crescimento na cultura.

A opção mais viável parece ser a utilização de técnicas simplificadas para descontaminação e semeadura em locais distantes e posterior remessa aos laboratórios com capacidade para acompanhamento das culturas. Neste aspecto existem várias técnicas de descontaminação e semeadura sem processos de concentração e neutralização, cujo nível de simplicidade de execução permite a

reprodutibilidade e disseminação da técnica de cultura de forma que possibilite sua implantação em postos de coleta ou unidades de saúde distantes.

Entre as várias técnicas simplificadas citadas pela literatura estudou-se a técnica descrita por KUDOH & KUDOH⁶⁸ (1974) que, em decorrência do baixo custo, simplicidade de execução e capacidade de crescimento de micobactérias, torna possível sua implantação em áreas carentes de recursos de laboratório e a possibilidade de remessa da amostra já semeada no meio de Ogawa modificado, de forma segura, permitindo ainda estudos adicionais para identificação de micobactérias e avaliação da resistência à drogas usadas no tratamento da tuberculose. Outro aspecto importante é a possibilidade de execução da cultura a partir de pequena porção de amostra e o menor risco de contaminação do laboratorista.

Para melhorar o rendimento da técnica descrita por Kudoh & Kudoh parece plausível que a semeadura de culturas em duplicata pode ser feita com a utilização de dois **swabs** - um para cada tubo - preparados com as porções (partículas) mais representativas da amostra, o que aumentaria a possibilidade da presença de bacilos viáveis e, conseqüentemente, melhor e maior crescimento de colônias de micobactérias.

Conclui-se que a técnica simplificada estudada, associada à baciloscopia nos moldes da técnica padrão para busca de casos, traria resultados vantajosos para os programas de controle da tuberculose, principalmente em áreas carentes.

CONCLUSÕES

1. A técnica de descontaminação e cultura descrita por Kudoh & Kudoh, utilizada para diagnóstico bacteriológico de tuberculose pulmonar, é de execução simples e rápida, o que viabiliza sua utilização em laboratórios de Saúde Pública em regiões carentes.

2. A técnica de descontaminação e cultura simplificada descrita por Kudoh & Kudoh apresentou comportamento semelhante à técnica de descontaminação de Petroff e semeadura em meio de cultura de Lowenstein-Jensen, no que se refere a crescimento de colônias em amostras paucibacilares e negativas ao exame direto, ocorrendo o mesmo nos demais casos, inclusive com leve vantagem para a técnica simplificada.

3. A comparação entre as técnicas de descontaminação de amostras e cultura descrita por Kudoh & Kudoh que utiliza o meio de Ogawa modificado com a técnica de descontaminação de Petroff em meio de cultura de Lowenstein-Jensen, permite concluir que as técnicas são semelhantes em termos de resultados, mas a técnica simplificada apresenta vantagens em relação ao custo, tempo gasto na execução, aparelhagem simples e necessidade de menor quantidade de amostra para ser processada.

4. Apesar da exequibilidade e viabilidade de utilização, em áreas carentes, da técnica de cultura simplificada descrita por Kudoh & Kudoh para diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar e da sobrevivência do bacilo de Koch por até 120 horas em parte das culturas mantidas em temperatura ambiente, os resultados obtidos não permitem conclusões definitivas sobre o sistema utilizado para transporte de amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, B.W. & MITCHISON, D.A. Counts of viable tubercle bacilli in sputum related to smear and culture gradings. *Med. Lab. Sci.*, 49: 94-8, 1992.
2. ANDRADE, L. de Diagnóstico bacteriológico da tuberculose. *Rev. Microbiol.*, 1(1): 43-60, 1970.
3. ANDRADE, L. de & GUTMAN, S. Técnica simplificada difásica para isolamento do bacilo da tuberculose de material colhido longe do laboratório. *Rev. Serv. Nac. Tuberc.*, 13(51): 235-54, 1969.
4. ARANTES, G.R. Aplicação de modelo matemático visando à escolha da melhor combinação de instrumentos para a descoberta e tratamento de casos de tuberculose pulmonar. *Rev. Saúde Pública*, 12: 455-70, 1978.
5. ARANTES, G.R. & RUFFINO-NETTO, A. Busca de casos de tuberculose pulmonar. *Rev. Saúde Pública*, 14: 185-93, 1980.
6. ARANTES, G.R. & TRIVELLATO, L.B. Cadastramento bacteriológico antituberculose: estudo preliminar para sua implantação em uma comunidade do Estado de São Paulo (Brasil). *Rev. Saúde Pública*, 10: 167-76, 1976.
7. ARANTES, G.R. & TRIVELLATO, L.B. Contaminação de escarro de sintomáticos respiratórios por micobactérias atípicas e suas implicações na busca de casos de tuberculose pulmonar. *Rev. Med.*, 19(2): 63-7, 1986.
8. ARMENGOL, R.; BERNAL, B.N. de; FERNÁNDEZ, B.P. de La tuberculosis y el SIDA en Venezuela. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 117(3): 262-9, 1994.

9. BILLO, N. La tuberculosis: un problema global. In: Congreso Panamericano de la Union Latinoamericana de Sociedades de Tisiologia y Enfermedades Respiratorias, 25º, Lima, 1993. *Libro de resúmenes*. p.186-9.
10. BISWAS, S.K.; SING, P.P.; BHAGI, R.P. & SHAH, A. Detection of tubercle bacilli in sputum smear by floatation method. *Indian J. Chest. Dis. & Al. Sci.*, 29(1): 8-12, 1987.
11. BLOOM, B.R. & MURRAY, C.J.L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*, 257: 1055-64, 1992.
12. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, Ministério da Saúde, 16(25-26): 10, 1984.
13. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, Ministério da Saúde, 17(1-2): 5, 1985.
14. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, Ministério da Saúde, 18(1-4): 8, 1986.
15. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, Ministério da Saúde, 19(1): 11, 1987.
16. CASAL, M.; AROCA, J.G.; JIMENEZ, R.; RUBIO, M. Estudio del retraso en la detección y tratamientos de casos de tuberculosis. *Rev. Clin. Esp.*, 178: 109-11, 1986.
17. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Diagnosis of tuberculosis by nucleic acid amplification methods applied to clinical specimens. *JAMA*, 270(13): 1528, 1993.
18. CHAN, W.; CHIA, M.; LEE, L.K.; MACFADYEN, D.M. Bacteriological measures for the detection of cases of pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ*, 45: 551-8, 1971.

19. CLANCY, L., RIEDER, H.L.; ENARSON, D.A.; SPINACI, S. Tuberculosis elimination in the countries of Europe and other industrialized countries. *Eur. Respir. J.*, 4: 1288-95, 1991.
20. COLLINS, F.M. Tuberculosis: the return of an old enemy. *Crit. Rev. Microbiol.*, 19(1): 1-16, 1993.
21. COWIE, R.L.; LANGTON, M.E.; ESCREET, B.C. Diagnosis of sputum smear - and sputum culture-negative pulmonary tuberculosis. *S. Afr. Med. J.*, 68: 878, 1985.
22. DANIEL, T.M.; MURILLO, G.L. de; SAWYER, J.A.; GRIFFIN, A.M.; PINTO, E.; DEBANNE, S.M.; ESPINOSA, P. ; CESPEDES, E. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134(4): 662-5, 1986.
23. DIAZ, R.; MONTORO, E.; MAESTRE, J.L.; ECHEMENDIA, M.; VALDIVIA, J.A. Polimerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 89(2): 211-2, 1994.
24. DIXON, J.M.S. & CUTHBERT, E.H. Isolation of tubercle bacilli from uncentrifuged sputum on pyruvic acid medium. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 96: 119-22, 1967.
25. DOMÍNGUEZ, J.M. & VIVAS, E.S. Smear-positive and culture-negative results of routine sputum investigations for the detection and therapy control of pulmonary tuberculosis. *Tubercle*, 58: 217-20, 1977.
26. DURAN, R.R. Tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *Inf. Ter. Segur. Soc.*, 11(1): 1-8, 1987.

27. ENARSON, D.A. The IUATLD "model" national tuberculosis programmes. In: Congreso Panamericano de la Union Latinoamericana de Sociedades de Tisiologia y Enfermedades Respiratorias, 25º, Lima, 1993. *Libro de resúmenes*. p.190-8.
28. ENGBAEK, H.C. & BENTZON, M.W. Transport of sputum specimens to a central tuberculosis laboratory. *Acta Tuberc. Scand.*, 45: 97-104, 1964.
29. ENGEL, H.W.B. & SEKHUIS, V.M. Comparison of a number of methods for isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum. *Sel. Pap.*, 17: 38-57, 1977.
30. ESPINAL, M. SIDA, infección por VIH y tuberculosis: su asociación e impacto en la República Dominicana. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 116(5): 452-64, 1994.
31. FODOR, T. & SZABO, I. Analysis of the effectivity of Loewenstein-Jensen's culture medium. *Sel. Pap.*, 15: 41-5, 1973.
32. FODOR, T.; KELENFFY, S.; SZABO, I. The cetylpyridinium bromide decontamination of sputum and its influence on the niacin test. *Tubercle*, 62: 271-2, 1981.
33. FUJIWARA, P.I. & HUBERMAN, R. Relación entre virus de la inmunodeficiencia humana, SIDA y tuberculosis en la Ciudad de Nueva York. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 117(5): 438-52, 1994.
34. GANGADHARAM, P.R. & DROUBI, A.J. Identification of mycobacteria by smear examination of the culture. *Tubercle*, 62: 123-7, 1981.
35. GARCIA, M.L.G.; GÓMEZ, J.L.V.; SANCHO, M.C.G.; ÁLVAREZ, R.A.S.; ZACARIAS, F.; AMOR, J.S. Epidemiología del SIDA y la tuberculosis. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 116(6): 546-65, 1994.

36. GEBRE, N.; KARISSON, U.; JÖNSSON, G.; MACADEN, R.; WOLDE, A.; ASSEFA, A.; MIÖRNER, H. Improved microscopical diagnosis of pulmonary tuberculosis in developing countries. *Trans.Roy Soc.Trop. Med. Hyg.*, 89(2): 191-3, 1995.
37. GERNEZ-RIEUX, C.; TACQUET, A.; TISON, F.; DEVULDER, B. Contribution a l'étude des techniques bactériologiques recommandées pour le dépistage de masse de la tuberculose pulmonaire. *Rev. Tuberc. Pneumol.*, 32(1): 21-36, 1968.
38. GIBBS, D.L. Transporte de muestras microbiologicas a un centro de enfermedades transmisibles en el tropico. *Bol.Of. Sanit. Panam.*, 89(5): 430-8, 1980.
39. GITHUI, W.; NUNN, P.; JUMA, E.; KARIMI, F.; BRINDLE, R.; KAMUNYI, R.; GATHUA, S.; GICHEA, C.; MORRIS, J.; OMWEGA, M. Cohort study of HIV-positive and HIV-negative tuberculosis, Nairobi, Kenya: comparison of bacteriological results. *Tuberc. Lung Dis.*, 73(4): 203-9, 1992.
40. GLOYD, S.; LÓPEZ, J.L.; MERCADO, F.J.; DURNING, J. Riesgo de infeccion por *Mycobacterium tuberculosis* en Jalisco, México. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 111(5): 393-401, 1991.
41. GONTIJO FILHO, P.P. & NASCIMENTO, D. do Eficiência dos meios de Loewenstein-Jensen e 7H10 no cultivo primário de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Nac. Tuberc.*, 17(66): 216-22, 1973.
42. GRZYBOWSKI, S. Impact of tuberculosis on human health in the world. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 125(3): 125-26, 1982.

43. GRZYBOWSKI, S.; ALLEN, E.A.; BLACK, W.A.; CHAO, C.W.; ENARSON, D.A.; ISAAC-RENTON, J.L.; PECK, S.H.S.; XIE, H.J. Inner-City survey for tuberculosis: evaluation of diagnostic methods. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 135 (6): 1311-5, 1987.
44. HOFFNER, S.E.; HAILE, M.; KÄLLENIUS, G. A biphasic system for primary isolation of mycobacteria compared to solid medium and broth culture. *J. Med. Microbiol.*, 37: 332-4, 1992.
45. HOPEWELL, P.C. Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features, management, and control of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, 15: 540-7, 1992.
46. HUEBNER, R.E.; GOOD, R.C.; TOKARS, J.I. Current practices in mycobacteriology: results of a survey of state public health laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 31(4): 771-5, 1993.
47. HUMAN, R.P. & JONES, G.A. Survival of bacteria in swab transport packs. *Med. Lab. Sci.*, 43: 14-8, 1986.
48. HYPPOLITE, P.R. & PAPE, J.W. Infección por VIH y tuberculosis en Haiti. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 118(2): 161-9, 1995.
49. ICHIYAMA, S.; SHIMOKATA, K.; TAKEUCHI, J. Comparative study of a biphasic culture system (Roche MB Check system) with a conventional egg medium for recovery of mycobacteria. *Tuberc. Lung Dis.*, 74(5): 338-41, 1993.
50. INFORME EPIDEMIOLÓGICO DO SUS. Brasília, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. 1(1): 61-72, 1992.
51. INFORME EPIDEMIOLÓGICO DO SUS. Brasília, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. 2(6): 142-4, 1993.
52. INFORME EPIDEMIOLÓGICO DO SUS. Brasília, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. 4: 122, 1995.

53. IWASAKI, T. & HIKAWA, Y. Estudios de muestras de frotis de expectoracion no fijados para coloracion y cultivo de bacilos tuberculosos. *Bol. Union Int. Tuberc.*, 54: 217-26, 1979.
54. JIMÉNEZ, A.H.G. Tuberculosis y SIDA en el Paraguay. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 118(3): 248-53, 1995.
55. KANTOR, I. N. de; ASTARLOA, L.;& MONTANER, L.J.G. Asociación entre tuberculosis e infeccion por virus de la inmunodeficiencia humana en la Argentina. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 116(4): 356-66, 1994.
56. KANTOR, I.N. de Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal. Buenos Aires.Oficina Sanitaria Panamericana, 1989. (Série de Monografias Científicas e Técnicas, nº 11).
57. KANTOR, I.N. de & ISOLA, N.C. Culture of *Mycobacterium tuberculosis* from non-fixed sputum smears. *Tubercle*, 66: 137-9, 1985.
58. KANTOR, I.N. de; BARRERA, L.; RITACCO, V.; MICELI, I. Utilidad del enzimoimmunoensayo en el diagnóstico de la tuberculosis. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 110(6): 461-70, 1991.
59. KATO, K.; YAMAMOTO, K.; SHIBATA, M.; KUREMATSU, S.; MITSUHASHI, O.; KUZE, A. IgG antibody level to mycobacterial glycoprotein in pulmonary tuberculosis by ELISA. *Eur. J. Respir. Dis.*, 71: 37- 41, 1987.
60. KENNEDY, N.; GILLESPIE, S.H.; SARUNI, A.O.S.; KISYOMBE, G.; McNERNEY, R.; NGOWI, F.I.; WILSON, S. Polimerase chain reaction for assessing treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 170: 713-6, 1994.
61. KENT, J.H. The epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis in the United States. *Med. Clin. North Am.*, 77(6): 1391-409, 1993.

62. KOCAGÖZ, T.; YILMAZ, E.; OZKARA, S.; KOCAGÖZ, S.; HAYRAN, M.; SACHEDEVA, M.; CHAMBERS, H.F. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J. Clin. Microbiol.*, 31(6): 1435-8, 1993.
63. KOCHI, A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*, 72: 1-6, 1991.
64. KRITSKI, A.; DALCOLMO, M.; BIANCO, R. del; MELO, F.F. de; PINTO, W.P.; SCHECHTER, M.; CASTELO, A. Associação tuberculose e infecção pelo VIH no Brasil. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 118(6): 542-54, 1995.
65. KUBICA, G.P. Correlacion entre los metodos de tincion y los resultados de los cultivos de micobacterias. *Bol. Union Int. Tuberc.*, 55(3-4): 119-27, 1980.
66. KUBICA, G.P.; GROSS, W.M.; HAWKINS, J.E.; SOMMERS, H.M.; VESTAL, A.L.; WAYNE, L.G. Laboratory services for mycobacterial diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 112(6): 773-87, 1975.
67. KUBICA, G.P.; KAUFMANN, A.J.; DYE, W.E. Comments on the use of the new mucolytic agent N-acetyl-L-cysteine, as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 89: 284-6, 1964.
68. KUDOH, S. & KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull. World Helath Organ*, 51: 71-82, 1974.
69. LATINI, M.D.S. de & LATINI, O.A. Conservadores de esputo para cultivo de micobacterias. *Rev. Argent. de Tuberc. Enferm. Pulm. Salud Publica*, 46(2): 23-9, 1985.

70. LATINI, O.; AMADIO, G.E.; DI LONARDO, M.; BARRERA, L.; KANTOR, I.N. de Metodos bacteriologicos empleados en el diagnostico de la tuberculosis en la Argentina. Evaluacion de la calidad. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 104(4): 355-64, 1988.
71. LEÓN, C.I.; GUERRERO, M.I.; BLANCO, E.G. de; NARANJO, N.; CAMARGO, D.; OROZCO, L.C. Calidad de la baciloscopia de esputo en la red de laboratorios de bacteriologia de tuberculosis en Colombia. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 115(2): 103-10, 1993.
72. LIGHT, R.J. Measures of response agreement for qualitative data: some generalizations and alternatives. *Psychol. Bull.*, 76(5): 365-77, 1971.
73. MA, Y., WANG, Y. & DANIEL, T.M. Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 134(6): 1273-5, 1986.
74. MACEDO, C.G. Mensaje del director. La tuberculosis. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 111(5), 1991.
75. MAUSNER, J. & BAHN, A. Examen en masa para deteccion de enfermedades y mantenimiento de la salud. Mexico, Ed. Interamericana, 1977. p. 221-37: Epidemiologia.
76. McMACKEN. M. & CASTRO, K.G. La tuberculosis y el virus de la inmunodeficiencia humana en los Estados Unidos, 1985-1992. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 117(1): 77-83, 1994.
77. MEDEROS, L.M.; VALDIVIA, J.A.; BRAVO, J.R. Estudio comparativo de diferentes medios para micobacterias, que incluye la nueva modificacion UIT-A. *Rev. Cub. Med. Trop.*, 38(1): 49-53, 1986.
78. MEHTA, J.B. & MORRIS, F. Impact of HIV infection on mycobacterial disease. *Am. Fam. Physician*, 45(5): 2203-11, 1992.

79. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Co-infecção TB/VIH/SIDA. *SIDA-Bol. Epidemiol.* Semana 36 a 39: 2-4, 1993.
80. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. *Manual de bacteriologia da tuberculose*. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde. 1980.
81. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. *Manual de normas para o controle da tuberculose*. Centro de Documentação do Ministério da Saúde. Brasília, 1984.
82. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. 2ª ed. Rio de Janeiro. Fundação Nacional de Saúde. 1994.
83. MITCHISON, D.A. Bacteriology of tuberculosis. *Trop. Doct.*, 4: 147-53, 1974.
84. MOKHTARI, Z. - Comparacion de dos metodos simples de tincion y de cultivo del bacilo tuberculoso: evaluacion tecnica y economica. *Bol. Union Int. Tub.*, 55(1-2): 53-7, 1980.
85. MOLINARI, J.A.; COTTONE, J.A.; CHANDRASEKAR, P.H. Tuberculosis in the 1990s: current implication for dentistry. *Compend. Cont. Educ. Dent.*, 14(3): 276-92, 1993.
86. NARAIN, J.P.; RAVIGLIONE, M.C.; KOCHI, A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. *Tuberc. Lung. Dis.*, 73: 311-21, 1992.
87. NARAIN, R.; RAO, M.S.S.; CHANDRASEKHAR, P. Microscopy positive and microscopy negative cases of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 103: 761-73, 1971.
88. NIERO, R. Emprego do método bacteriológico nos programas de controle da tuberculose. *Rev. Saúde Pública*, 11: 416-26, 1977.

89. NIERO, R. & BELLO, M.J.A. Casos positivos somente à cultura em clientes sintomáticos respiratórios da demanda de um centro de saúde (dados preliminares). In: Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 9º; CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12º, São Paulo, 1983. Anais. São Paulo, 1983.
90. NIERO, R.; BELLO, M.J.A.; POSSAS, J.S.B. Estudo comparativo entre os métodos de coloração fluorescente e Ziehl-Neelsen em secreções pulmonares. *Rev. Saúde Pública*, 12: 250-7, 1978.
91. NOLTE, F.S.; METCHOCK, B.; McGOWAN JR., J.E.; EDWARDS, A.; OKWUMABUA, O.; THURMOND, C. MITCHELL, P.S.; PLIKAYTIS, B.; SHINNICK, T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polimerase chain reaction and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 31(7): 1777-82, 1993.
92. NUNN, P.P. & ENARSON, D.A. Tuberculosis-from neglect to control. *Trans.Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 129-31, 1994.
93. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD Asociación de VIH y tuberculosis: guía técnica. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 115(4): 356-69, 1993.
94. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Centro Panamericano de Zoonosis. Bacteriologia de la tuberculosis. El cultivo del *Mycobacterium tuberculosis*. Buenos Aires, 1985 (Nota técnica nº 27).
95. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Control de la tuberculosis. Manual sobre métodos y procedimientos para los programas integrados. Washington, Organizacion Panamericana de la Salud, 1987. p. 21-31. (Publicación Científica nº 498): Detección de casos.

96. OROZCO, L.C.; FRANCO, C.I.L.; BLANCO, E.G. de; RAMOS, O.Q. de ; MORENO, A.I.U. de El cultivo de esputo para el diagnostico de la tuberculosis pulmonar. *Biomedica*, 5(1-2): 24-5, 1985.
97. PALHANO JUNIOR, L.; NASCIMENTO, F.F.; SANTOS, U.M. Meio de cultura alternativo para o isolamento e identificação do bacilo da tuberculose. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 16(4): 15-6, 1984.
98. PARAMASIVAN, C.N.; NARAYANA, A.S.L.; PRABHAKAR, R.; RAJAGOPAL, M.S.; SOMASUNDARAM, P.R.; TRIPATHY, S.P. Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results. *Tubercle*, 64: 119-24, 1983.
99. PASVOL, G. Tuberculosis, past, present and future. *J. Infec.*, 27(1): 5-10, 1993.
100. PEÑA, R.T.; FIOL, J.J.; CORZO, L.C.; ÁVILA, J.P.; GUTIÉRREZ, O.H.; FIGUEROA, A.M.; SUÁREZ, R.G.; PEÑA, M.S. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y la tuberculosis en Cuba. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 119(1): 66-73, 1995.
101. PETROFF, S.A. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *J. Exp. Med.*, 1: 38-42, 1915.
102. PETROFF, S.A. Some cultural studies on the tubercle bacillus. *Johns Hopkins Hosp. Bull*, 26: 276-9, 1915.
103. PIERRI, C.; OLIVIER, C.; LECOSSIER, D.; BOUSSOUGANT, Y., YENI, P.; HANCE, A.J. Diagnosis of primary tuberculosis in children by amplification and detection of micobacterial DNA. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 147: 420-4, 1993.

104. PINTO, W.P.; HADAD, D.J.; PALHARES, M.C.A.; FERRAZOLLI, L.; TELLES, M.A.; UEKI, S.Y.M.; SANTOS, M.T.F., PLACCO, A.L.N.; SAUAIA, N.; PALACI, M. Drug resistance of *M. tuberculosis* isolated from patients with HIV infection seen at an AIDS reference center in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 38(1): 15-22, 1996.
105. PIO, A. El futuro de la lucha antituberculosa. Problemas y perspectivas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 96(2): 108-18, 1984.
106. PIO, A. & WESTERN, K. Enfoques para el control de la tuberculosis en las Americas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 80(4): 281-6, 1976.
107. PITCHENIK, A.E. Tuberculosis control and the AIDS epidemic in developing countries. *Ann. Intern. Med.*, 113(2): 89-91, 1990.
108. PORTER, J. & KESSLER, C. Tuberculosis in refugees: a neglected dimension of the global epidemic of tuberculosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89(3): 241-2, 1995.
109. RADHAKRISHNA, S.; NAIR, N.G.K.; KACHIRAYAN, M.; RAMANATHAN, A.M. Mathematical study of the contamination phenomenon in the culture of tubercle bacilli. *Tubercle*, 61: 221-9, 1980.
110. RATNAM, S.; STEAD, F.A.; HOWES, M. Simplified acetylcysteine-alkali digestion-decontamination procedure for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 25(8): 1428-32, 1987.
111. RAVIGLIONE, M.C.; NARAIN, J.P.; KOCHI, A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis, and treatment. *Bull World Health Organ*, 70(4): 515-26, 1992.
112. RIEDER, H.L.; CAUTHEN, G.M.; COMSTOCK, G.W.; SNIDER JUNIOR, D.E. Epidemiology of tuberculosis in the United States. *Epidemiol. Rev.*, 11: 79-98, 1989.

113. ROUILLON, A.; PERDRIZET, S.; PARROT, R. Metodos de control de la tuberculosis. Washington, D.C., Organizacion Panamericana de la Salud, 1977. p. 1-30. (Publicación Científica, 346): La transmission del bacilo tuberculoso: el efecto de la quimioterapia..
114. RUFFINO-NETTO, A. Avaliação do excesso de casos de tuberculose atribuídos a infecção VIH/SIDA: ensaio preliminar. *Rev. Saúde Pública*, 29(4): 279-82, 1995.
115. SALES, L.H.M.; SANTORO, H.P. de M.; AZEVEDO, F.S. de; ANDRADE, E.M. de Critérios para o diagnóstico da tuberculose pulmonar oculta. *Arq. Bras. Med.*, 60(6): 437-8, 1986.
116. SALINAS, G.M. Patogenia y epidemiologia de la tuberculosis: vision general. *Bol. Hosp. Vina del Mar*, 41(4): 4-7, 1985.
117. SANDINO, E.G. Programa de control de tuberculosis en Colombia. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 86(5): 398-405, 1979.
118. SANTIAGO, A. da C. A baciloscopia e a cultura nos programas de luta contra a tuberculose. *Rev. Div. Nac. Tuberc.*, 15(56): 283-92, 1970.
119. SANTIAGO, A. da C. Participação da bacteriologia na luta contra a tuberculose. *Rev. Baiana Saúde Públ.*, 12(1/3): 44-63, 1985.
120. SANTIAGO, A. da C. Valor comparativo da baciloscopia e da cultura no diagnóstico bacteriológico e seguimento do tratamento da tuberculose. *Rev. Serv. Nac. Tuberc.*, 12(48): 341-53, 1968.
121. SATHIANATHAN, S. & KHALIL, A. A simple diagnostic culture method for use in a tuberculosis control programme. *Bull World Health Organ*, 59(6): 919-21, 1981.

122. SEWELL, D.L.; RASHAD, A.L.; ROURKE JR, W.J.; POOR, S.L.; McCARTHY, J.A.C.; PFALLER, M.A. Comparison of the sepi-check AFB and BACTEC systems and conventional culture for recovery of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 31(10): 2689-91, 1993.
123. SHAH, D.H.; DEVDHAR, M.N.; GANATRA, R.D.; KALE, P.N.; VIRDI, S.S.; DESHMUKH, M.D. Modified rapid radiometric method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, 12(4): 333-5, 1985.
124. SILVA, E.A.M. da; SATO, D.N.; TELLES, M.A. da S.; MARTINS, M. da C.; PALACI, M.; UEKI, S.Y.M. Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo, 1986 a 1990. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52(1/2): 37-40, 1992.
125. SILVA, E.A.M. da; SATO, D.N.; TELLES, M.A. da S.; ZAMBONI, I.; FONSECA, Y.S.K. A bacteriologia da tuberculose: atividade do Instituto Adolfo Lutz - Sorocaba - SP. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52(1/2): 71-6, 1992.
126. STAGER, C.E.; LIBONATI, J.P.; SIDDIQI, S.H.; DAVIS, J.R.; HOOPER, N.M.; BAKER, J.F.; CARTER, M.E. Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. *J. Clin. Microbiol.*, 29(1): 154-7, 1991.
127. SUDRE, P.; DAM, G.; KOCHI, A. Tuberculosis, a global overview of the situation today. *Bull. World Health Organ*, 70(2): 149-59, 1992.
128. SUSEMIHL, M.A.A. de M.M.; FERRAZOLLI, L.; UEKI, S.Y.M.; GIMENEZ, R.D.; PALACI, M. Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 29(2): 51-4, 1993.

129. TENOVER, F.C.; CRAWFORD, J.T.; HUEBNER, R.E.; GEITER, L.J.; HORSBURGH JR, C.R.; GOOD, R.C. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J. Clin. Microbiol.*, 31(4): 767-70, 1993.
130. TORRES, B.C.; CRUZ, R. de C.S.; ALBUQUERQUE, Y.M.M. de; SILVA E.F. da Comportamento epidemiológico da tuberculose no Estado de Pernambuco no período de 1982 a 1992. *Rev. Bras. Med.*, 53(4): 217-25, 1996.
131. TRIVELLATO, L.B. & FERNANDES, L.C. Avaliação da eficiência de dois métodos baciloscópicos no diagnóstico dos B.A.A.R., utilizando como padrão a cultura de escarro. *Rev. Med.*, São Paulo, 19(1): 1-4, 1986.
132. UTTLEY, A.H.C. & POZNIAK, A. Resurgence of tuberculosis. *J. Hosp. Infect.*, 23: 249-53, 1993.
133. VASANTHAKUMARI, R. A single step culture technique for tubercle bacilli. *Tubercle*, 71: 267-70, 1990.
134. WAISBICH, E. & BARROS, R.F. Crescimento do *M. tuberculosis* no meio de cultura de Loewenstein-Jensen e nesse meio adicionado de RNA (Dados preliminares). *Folha Méd.*, 55(1): 153-6, 1967.
135. WAISBICH, E.; FERNANDES, L.R.V.; ROSSI, A.L.R. A comparison between the Loewenstein-Jensen and American Trudeau Society culture media for isolation of tubercle bacilli in pathological specimens negative to microscopic examination. *Rev. Microbiol.*, 2(2): 87-91, 1971.
136. WAYNE, L.G. Microbiology of tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 125(3): 31-41, 1982.

137. WEIL, D.E.C. *Exitos e fracasos de los programas nacionales de tuberculosis y una nueva estrategia global*. In: Congreso Panamericano de la Union Latinoamericana de Sociedades de Tisiologia y Enfermedades Respiratorias, 25º, Lima, 1993. *Libro de resúmenes*. p.199-200.
138. WHITTIER, P.S.; WESTFALL, K.; SETTERQUIST, S.; HOPFER, R.L. Evaluation of the septi-check AFB system in the recovery of mycobacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11: 915-8, 1992.
139. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Declares Tuberculosis a Global Emergency. *Health Horiz.*, 19: 3, 1993.
140. WORLD HEALTH ORGANIZATION Tuberculosis control. Geneva, 1982 (Technical Report Series, 671).
141. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Estrategias de control e investigación de la tuberculosis en el decenio de 1990: memorándum de una reunión de la OMS. *Bol. Of. Sanit. Panm.*, 114(5): 429-36, 1993.
142. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Union Against Tuberculosis. Tuberculosis control. *Tubercle*, 63: 157-69, 1982.
143. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis control and research strategies for the 1990s: memorandum from a WHO Meeting. *Bull World Health Organ*, 70(1) : 17-21, 1992.
144. YÁÑEZ, A.; BACHELETE, M.; VALENZUELA, M.T.; VALENZUELA, P., HENRÍQUEZ, A.; CHILD, R. La infección por VIH y sus consecuencias para la endemia tuberculosa en Chile. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 119(2): 166-78, 1995.
145. YÁÑEZ, A. del V. La tuberculosis en la década de 1990. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 111(5): 461-9, 1991.

146. YANEZ, A. Epidemiologia de la tuberculosis. In: Congreso Panamericano de la Union Latinoamericana de Sociedades de Tisiologia y Enfermedades Respiratorias, 25º, Lima, 1993. *Libro de resúmenes*. p.153-7.
147. ZACARIAS, F.; GONZÁLEZ, R.S.; CUCHI, P.; YÁÑEZ, A.; PERUGA, A.; MAZIN, R.; BETTS, C.; WEISSENbacher, M. El SIDA y su interacción con la tuberculosis en America Latina y el Caribe. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 116(3): 250-62, 1994.
148. ZAHER, F. & MARKS, J. Methods and medium for the culture of tubercle bacilli. *Tubercle*, 58: 143-45, 1977.
149. ZULUAGA, L.; BETANCUR, C.; ABAUNZA, M. & LONDOÑO, J. Prevalencia de tuberculosis y enfermedad respiratoria en personas mayores de 15 años de la comuna nororiental de Medellín, Colombia. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 111(5): 406-13, 1991.
150. ZULUAGA, L.; BETANCUR, C.; ABAUNZA, M.; LONDOÑO, J. Encuesta de conocimientos sobre la tuberculosis. Comuna nororiental de Medellín, Colombia. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 111(5): 414-22, 1991.

ANEXO I

Nº _____

Nº _____

Paciente

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Cor: _____ Peso: _____

Ocupação: _____

Endereço: _____

Amostra para: _____ Diagnóstico _____ Tratamento _____

Data da coleta: _____ Hora: _____

Data de recebimento pelo Laboratório: _____ Hora: _____

Data da análise: _____ Hora: _____

Temperatura ambiental (Laboratório): _____

Manutenção da amostra sob refrigeração, transporte, etc.: _____

RESULTADOS

Baciloscopia:

Cultura: Técnica de Petroff

Técnica de Kudoh & Kudoh

Dia

2º

2º

7º

7º

15º

15º

30º

30º

45º

45º

60º

60º

Obs.: _____

* Os dados relacionados ao paciente só serão anotados se forem necessários para outros estudos.

ANEXO 3

Fórmulas dos meios de Lowenstein-Jensen, Ogawa e Ogawa modificado por Kudoh & Kudoh⁶⁸.

Componente-produtos	LJ	Ogawa	Ogawa modificado
• Fosfato monopotássico	0,4g	3,0g	2,0g
• Sulfato de magnésio	0,04g	-	-
• Citrato de magnésio	0,1g	-	0,1g
• Glutamato de sódio	-	1,0g	0,5g
• Asparagina	0,6g	-	-
• Glicerina bidestilada	2,0mL	6,0mL	4,0mL
• Água destilada	100,0mL	100,0mL	100,0mL
• Ovo homogeneizado	167,0mL	200,0mL	200,0mL
• Verde malaquita 2%	3,3mL	6,0mL	4,0mL

ANEXO 4

TABELA I.A - Distribuição de amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento, positivas ao exame direto, relacionados aos resultados das culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

DIRETO	PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
P	P	P	23	48,9
P	P	nP	3	6,4
P	nP	P	7	14,9
P	nP	nP	14	29,8
TOTAL			47	100,0

TABELA I.B - Distribuição das amostras de escarro recebidas para diagnóstico e controle de tratamento, negativas ao exame direto, relacionados aos resultados das culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

DIRETO	PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
N	P	P	3	0,7
N	P	nP	3	0,7
N	nP	P	3	0,7
N	nP	nP	447	97,9
TOTAL			456	100,0

TABELA II - Distribuição das amostras de escarro recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar, de acordo com resultados obtidos nas culturas executados pelas técnicas PLJ e KOK, relacionados aos resultados dos exames diretos fornecidos pelo SESA. Araraquara-SP, 1991-1993.

DIRETO	PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
P	P	P	21	4,6
P	P	nP	-	-
P	nP	P	4	0,9
P	nP	nP	2	0,4
N	P	P	3	0,7
N	P	nP	3	0,7
N	nP	P	3	0,7
N	nP	nP	425	92,0
TOTAL			461	100,0

TABELA II.A- Distribuição das amostras de escarro recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar positivas ao exame direto relacionadas aos resultados das culturas executados pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

DIRETO	PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
P	P	P	21	77,8
P	P	nP	-	-
P	nP	P	4	14,8
P	nP	nP	2	7,4
TOTAL			27	100,0

TABELA II.B - Distribuição das amostras de escarro recebidas para diagnóstico de tuberculose pulmonar negativas ao exame direto relacionadas aos resultados das culturas executados pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

DIRETO	PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
N	P	P	3	0,7
N	P	nP	3	0,7
N	nP	P	3	0,7
N	nP	nP	425	97,9
TOTAL			434	100,0

TABELA III - Distribuição das amostras recebidas para controle de tratamento, de acordo com resultados obtidos nos exames diretos e culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

DIRETO	PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
P	P	P	2	4,8
P	P	nP	3	7,1
P	nP	P	3	7,1
P	nP	nP	12	28,6
N	P	P	-	-
N	P	nP	-	-
N	nP	P	-	-
N	nP	nP	22	52,4
TOTAL			42	100,0

TABELA III.A - Distribuição de amostras de escarro recebidas para controle de tratamento, positivas ao exame direto relacionados aos resultados obtidos nas culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

DIRETO	PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
P	P	P	2	10,0
P	P	nP	3	15,0
P	nP	P	3	15,0
P	nP	nP	12	60,0
TOTAL			20	100,0

TABELA III.B - Distribuição de amostras de escarro recebidas para controle de tratamento, negativas ao exame direto relacionadas aos resultados obtidos nas culturas pelas técnicas PLJ e KOK. Araraquara-SP, 1991-1993.

DIRETO	PLJ	KOK	Nº DE AMOSTRAS	%
N	P	P	-	-
N	P	nP	-	-
N	nP	P	-	-
N	nP	nP	22	100,0
TOTAL			22	100,0

ANEXO 5

QUADRO I - Distribuição dos resultados das culturas executadas pela técnica KOK incubadas imediatamente e até 120 horas após semeadura e simulação de transporte. Araraquara-SP, 1994-1995.

Nº Ordem	Código Lab.	D/T	Direto	Duração do transporte/horas						Horas (início da análise)
				0	24	48	72	96	120	
01	05	T	P+	P	P	P	P	P	P	48
02	06	D	N	P	P	P	P	P	P	48
03	08	T	P+	P	P	P	P	P	P	24
04	29	D	P+++	P	P	P	P	P	P	<12
05	30	D	p+	P	P	C	P	P	N	24
06	31	D	P+	P	P	P	P	P	P	48
07	32	D	P++	P	P	P	P	P	P	24
08	33	D	P+	P	P	P	P	P	P	24
09	34	D	P+	P	P	C	P	P	P	24
10	35	D	P+++	P	P	P	N	P	C	24
11	36	D	P++	P	P	P	P	C	P	24
12	37	D	P+++	P	P	P	P	P	P	<12
13	38	D	P+++	P	P	P	P	P	P	<12
14	39	D	P++	N	N	N	N	N	N	24
15	40	D	P+	P	P	P	P	P	P	24
16	41	D	P+	P	P	P	P	P	P	24
17	42	D	P+	P	N	N	C	N	N	<12
18	43	D	P+	N	N	P	C	C	P	96
19	44	T	P+	N	N	N	N	N	N	96
20	45	D	P+++	P	P	P	C	N	N	<12
21	46	T	P+	N	N	N	N	N	N	<12
22	47	D	P+	P	N	N	N	N	N	24
23	48	D	P+	N	N	N	N	N	C	24
24	49	D	P+	P	P	P	P	N	C	<12
25	50	D	P+++	N	N	N	N	N	N	<12
26	51	D	P+++	N	P	P	N	N	N	<12
27	52	D	P+	N	N	N	N	N	N	<12
28	53	D	P+	N	N	N	N	N	N	24
29	54	D	P+	N	N	N	N	N	N	24
30	55	D	P+++	N	N	N	C	C	C	72

Continuação Quadro I

Nº Ordem	Código Lab.	D/T	Direto	Duração do transporte/horas						Horas (início da análise)
				0	24	48	72	96	120	
31	59	T	P+	C	C	C	C	C	C	<12
32	60	T	P+	C	C	C	C	C	C	<12
33	61	D	P++	N	N	N	N	N	N	<12
34	62	D	P+	P	P	P	P	N	N	<12
35	63	D	P++	P	P	P	P	P	P	24
36	64	D	P+	P	P	P	N	N	N	24
37	65	D	P+	P	P	P	P	N	N	<12
38	66	D	P++	P	P	N	P	N	N	24
39	67	D	P+	P	P	P	P	P	P	<12
40	68	D	P+	P	P	P	C	P	P	<12
41	69	D	P+	N	N	N	N	N	N	72
42	70	T	P++	P	P	P	N	N	C	72
43	71	D	P+	N	N	N	N	N	N	<12

P= Positivo; N= Negativo; C= Contaminado; D= Diagnóstico; T= Tratamento