

ELISABETE APARECIDA DE ALMEIDA

Sensibilidade de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* as drogas anti tuberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial

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

SÃO PAULO

2009

ELISABETE APARECIDA DE ALMEIDA

Sensibilidade de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* as drogas anti tuberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial

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

**Área de Concentração: Microbiologia
Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky**

**SÃO PAULO
2009**

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

© reprodução total

Almeida, Elisabete Aparecida de.

Sensibilidade de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* as drogas anti tuberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial / Elisabete Aparecida de Almeida. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Jorge Timenetsky.

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

Versão do título para o inglês: Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antituberculous drugs by traditional and automated means in diagnosis and treatment of people with tuberculosis .

Descritores: 1. *Mycobacterium tuberculosis* 2. Tuberculose pulmonar 3. Resistência microbiana as drogas 4. Avaliação do desempenho I. Timenetsky, Jorge II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0183/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elisabete Aparecida de Almeida.

Título da Tese: Sensibilidade de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* as drogas anti tuberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial

Orientador(a): Jorge Timenetsky.

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

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:

Presidente: Assinatura:.....
Nome:

ESTE ESTUDO FAZ PARTE DO CONVÊNIO DE COOPERAÇÃO CIENTÍFICA FIRMADO ENTRE O LABORATÓRIO DO INSTITUTO CLEMENTE FERREIRA – SECRETARIA DO ESTADO DA SAUDE DO ESTADO DE SÃO PAULO E O LABORATÓRIO DE MICOBACTÉRIAS DO DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ofereço esta tese *in memorium* aos meus pais: Jovelino de Almeida e Catharina Ascensão
Marques de Almeida

Hoje agradeço a Deus, por ter me proporcionado vocês, como meus primeiros mestres, sábios, formados pela escola da vida.

Receberam-me em seus braços e ninaram-me ao som de Chopin, Vivaldi e Bach, mas isso durou pouco.

Logo eu os ninava aos domingos após o almoço, com leituras de cansativas páginas de jornal. Desde muito cedo me motivaram a leitura e a busca incessante por cultura. .

Ensinaram-me a ser perseverante e jamais desistir de um sonho.

Quisera o destino que hoje não pudessem participar comigo desta vitória, este sonho que tantas vezes idealizamos juntos e que igual número de vezes foi adiado.

Mas minha gratidão é imensa, ao recordar vocês conversando sentados ao redor da mesa da cozinha, como seria fantástico formar suas meninas.

E o sonho foi além de um simples diploma de faculdade e o futuro que vocês diziam ser tão maravilhoso alcanço hoje!

E concluo se dificuldades sofri, maiores teriam sido sem seus ensinamentos. Sem as palavras doces e meigas de minha mãe e a firmeza de meu pai. Sempre que tropecei lembrei que foram vocês que me ensinaram a levantar. E quando olho o futuro e sinto medo, ele se vai quando lembro de seu otimismo "pai" e ele acaba quando recorro à fé que vocês plantaram em mim.

AGRADECIMENTOS

A meus filhos Lucas e Ana Carolina, por fazerem tudo na minha vida valer à pena! Agradeço por sua compreensão pelas minhas ausências me dedicando a este trabalho pelo estímulo constante, o amor recebido diariamente. E principalmente pelo orgulho que sentem de mim, que me impulsiona cada vez mais a superar minhas limitações. Amo vocês.

A minha irmã Maria Gorete e meu cunhado Pedro, por estarem presentes nos momentos de alegria e tristeza de minha vida. Mostrando o verdadeiro significado de uma família.

A minha irmã Selma, por todas as vezes que me substituiu junto aos meus filhos, possibilitando meu progresso profissional.

A Dr. Fernando Augusto Fiuza de Melo, exemplo de coragem, capacidade e dinamismo, de quem tenho honra de poder considerar-me mais uma de suas discípulas, e a quem tenho eterna gratidão por ter-me acompanhado nesta tese desde o início. Obrigada, pela sua tolerância para com minhas falhas, pelo seu profissionalismo. Pelo amor que dedicou a este trabalho. Jamais medindo esforços, muitas vezes esquecendo-se até mesmo de cuidar de sua saúde, para me orientar.

A Dra. Margarida Fiúza de Melo, pela revisão ortográfica de minha qualificação. Pelo estímulo constante durante este trabalho.

A Dr. Jorge Barros Afiune meu amigo, pelo apoio e incentivo, e todos os conselhos e ensinamentos transmitidos, pelo estímulo dado à minha carreira dentro e fora do Instituto Clemente Ferreira. “Não só neste trabalho, mas durante todos estes anos de convívio”.

A toda equipe técnica do Instituto Clemente Ferreira, pelo apoio, carinho e torcida para que eu conseguisse concluir esta tese! A Sociedade Benéfica Clemente Ferreira, pelo apoio a esta tese.

Aos amigos do laboratório de micobactérias do Instituto Clemente Ferreira. Pela amizade de cada um de vocês, que ultrapassou os limites profissionais e me acompanhou nos momentos de tristeza e alegria que vivenciei durante todos os anos que trabalhamos juntos. Quando pensei em agradecimentos pessoais, desisti! Porque entendo, que só alcancei mais esta vitória, porque somos uma equipe. Graças aos esforços individuais esta conquista foi possível! Terei sempre um imenso orgulho, de pertencer a esta equipe: Beatriz, Claudia, Cleri, Cleusa, Delurce, Edgar, Elias, Elso, Idemar, Jaciene, José, Lucilene, Lucas, Marcos, Maria Tavares Marlene, Miriam, Raquel, Sonia.

Ao Sr. Antonio, pelo carinho, orações, encorajamento. É um presente conhecer uma pessoa tão especial como o senhor e ser sua amiga.

Ao Dr. Adalto Castelo, pelos cálculos estatísticos.

A Dr. Jorge Timenetsky, por ter me proporcionado a oportunidade de concluir esta tese no Instituto de Ciências Biomédicas II, da Universidade de São Paulo. Pela maneira paciente, compreensiva e incentivadora. Obrigada, por acreditar no meu trabalho, no meu profissionalismo, pela tolerância às minhas falhas e dificuldades. Agradeço a sua parceria e desejo que sua jornada seja repleta de êxitos.

*“Sonhar
mais um sonho impossível.*

*Lutar
quando é fácil ceder.*

*Vencer
o inimigo invisível. . . .*

*Voar
num limite improvável.*

*Tocar
o inacessível chão”*

Chico Buarque de Holanda

RESUMO

ALMEIDA, E. A. **Sensibilidade de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* as drogas anti tuberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial.** 2009. 79 f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O diagnóstico precoce da tuberculose contribui no controle da transmissão do agente pelo início correto do tratamento. Em centro de referência terciário o diagnóstico da tuberculose é crucial pelo atendimento de casos quase sempre mais complicados. Neste estudo avaliou-se a aplicação rotineira de um método automatizado e outro convencional na determinação do perfil de sensibilidade a drogas anti-micobacterianas de 126 isolados clínicos de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. O método TSMA foi comparado com o método das Proporções-TSMP. Os isolados clínicos foram obtidos de pacientes sem tratamento (NT) e com tratamento quimioterápico. Estes foram divididos em: tratados anteriormente (RT) e multirresistentes (MDR). Foram avaliadas as seguintes drogas: Estreptomicina, Hidrazida, Rifampicina e Etambutol. A concordância de resultados entre TSMP e TSMA, para Rifampicina no grupo NT, foi de 98. 3%, sendo $p=1.000$ e $Kappa=0.659$. No grupo RT, houve concordância de 94. 3%, sendo $p=0.625$ e $Kappa=0.639$, no grupo MR, a concordância foi de 96. 6%, sendo $p=0.625$ e $Kappa=0.651$. Para Hidrazida, no grupo NT, a concordância foi de 88. 5%, sendo $p=0.125$ e $Kappa=0.408$ no grupo RT foram de 88. 6%, sendo $p=0.625$ e $Kappa=0.645$ no grupo de pacientes MR, foi de 86,7%, sendo $p=0.625$ e $Kappa=0.053$. Para Estreptomicina no grupo NT, a concordância foi de 93. 5%, sendo $p=0.125$ e $Kappa=0.635$. No grupo RT, foi de 79. 4%, sendo $p=0.016$ e $KAPPA=0.296$ no grupo MR, foi de 76,6%, sendo $p=0.453$ e $Kappa=0.533$. Para Etambutol, no grupo NT, a concordância foi de 93. 4%, sendo $p=0.125$ e $Kappa=0.315$, no grupo RT foi de 94. 3%, sendo $p=0.500$ e $Kappa=0.478$. No grupo MR, foi de 72. 4%, sendo $p=0.70^a$ e $Kappa=0.455$. A metodologia automatizada mostrou-se mais rápida que a convencional na avaliação da sensibilidade das micobactérias em estudo e revelou maior número de isolados resistentes a antibióticos. O uso da metodologia automatizada no Brasil é importante em unidade de referência ambulatorial terciária para agilizar a estratégia no tratamento da tuberculose pulmonar.

Palavras-Chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Teste de sensibilidade; Referência ambulatorial; Tuberculose pulmonar.

ABSTRACT

ALMEIDA, E. A. **Susceptibility of *M. tuberculosis* to antituberculous drugs by traditional and automated means in diagnosis and treatment of people with tuberculosis.** 2009. 79 p. Thesis (Doctorate) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Early detection of tuberculosis contributes for agent control and transmission by adequate treatment. In tertiary reference centers, tuberculosis diagnosis is crucial to optimize attendance of complicated cases. In this study, we evaluated the routinely application of an automated system and the conventional method used to determine the profile of sensitivity to antimycobacterial drugs of 126 clinical isolates of the complex *M. tuberculosis*. Sensitivity test-automated method (STAM) was compared to proportion method (STPM). Clinical isolates were obtained from patients without treatment (WT) and in chemotherapeutic treatment. This group was divided into: previously treated (PT) and multidrug resistant (MDR). Evaluated drugs: Streptomycin, Hidrazin, Rifampin and Ethambutol. Concordant result between STPM and STAM, for Rifampin, in WT group, was 98. 3%, $p=1.000$ and $Kappa=0.659$. PT group, concordance was 94. 3%, $p=0.625$ and $Kappa=0.639$; in MDR group, concordance was 96. 6%, $p=0.625$ and $Kappa=0.651$. For Hidrazin, WT group, concordance was 88. 5%, $p=0.125$ and $Kappa=0.408$; in PT group, 88. 6%, $p=0.625$ and $Kappa=0.645$; for MDR group, 86. 7%, $p=0.625$ and $Kappa=0.053$. For Streptomycin, PT group concordance was 93. 5%, $p=0.125$ and $Kappa=0.635$. In PT group, concordance was 79,5%, $p=0.016$ and $Kappa=0.296$; in MDR group, 76. 6%, $p=0.453$ and $Kappa=0.533$. For Ethambutol, WT group concordance was 93. 4%, $p=0.125$; in PT group 94. 3%, $p=0.500$ and $Kappa=0.478$. Concordance of MDR group was 72. 4%, $p=0.70$ and $kappa=0.455$. Evaluation of mycobacterial sensitivity was faster in the automated method when compared with the conventional method, and also revealed higher numbers of resistant isolates. Thus, the use of automated methodology in Brazil is important in tertiary reference centers to speed up the strategy in pulmonary tuberculosis treatment.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; Sensitivity test; Outpatient reference; Pulmonary tuberculosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

TB= Tuberculose
MTC= Complexo *M. tuberculosis*
MNT= Micobactéria não Tuberculosa
TBMR= Tuberculose Multirresistente
TBXDR= Tuberculose Excessivamente Resistente
E-1 = Esquema de tratamento 1
E-2= Esquema de tratamento 2
E-1R= Esquema de tratamento 1 reforçado
E-3= Esquema de tratamento 3
AM=Amicacina
CLZ=Clofazimina
SM= Estreptomicina
INH=Hidrazida
RFA= Rifampicina
EMB= Etambutol
Et= Etionamida
OFX= Ofloxacina
TRZ=Terizidon
VT= Virgem de tratamento
NT= Não tratados
RT= Retratamento
MR= Multirresistente
RC= Retorno pós cura
RA= Retorno pós abandono
ZN= Ziehl-Neelsen
BAAR= Bacilos Álcool Ácidos Resistentes
LJ = Lowenstein Jensen
SAT = Sistema automatizado
LEDs= Diodos Emissores de Luz
TSMP = Teste de sensibilidade pelo método das proporções
TSMA= Teste de sensibilidade pelo método automatizado
PANDA= Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidixo, Trimetoprim e Azlocilina
OADC= Albumina bovina, Dextrose, Catalase e Ácido oléico
RRM = Método do coeficiente de resistência
PNB= Ácido Para nitrobenzóico
OMS= Organização Mundial da Saúde
ICF = Instituto Clemente Ferreira
IAL= Instituto Adolfo Lutz

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 AMOSTRAGEM: COLETA DE ESCARRO	28
3.2 PREPARO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	29
3.2.1 DIGESTÃO E DESCONTAMINAÇÃO	29
3.3 CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS	29
3.4 BACILOSCOPIA	30
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS	30
3.6 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICOBACTERIANOS	31
3.6.1 MÉTODO DAS PROPORÇÕES (TSMP)	31
3.6.2 SISTEMA AUTOMATIZADO (TSMA)	32
4 RESULTADOS	36
4.1 RIFAMPICINA – RMP	36
4.2 HIDRAZIDA – INH	37
4.3 ESTREPTOMICINA – SM	38
4.4 ETAMBUTOL – EMB	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	53
ANEXOS A – RESULTADOS COMPARATIVOS DA SENSIBILIDADE AOS ANTI MICOBACTERIANOS DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES VT, RT E MR PELAS METODOLOGIAS TSMP E TSMA	54
ANEXOS B – MÉTODO DE PETROFF PARA DESCONTAMINAÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS	65
ANEXOS B.1 – SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO A 4 %	65
ANEXOS B.2 – SOLUÇÃO DE HCL 1,0 N CONTENDO 0,004 % DE VERMELHO DE FENOL	65

ANEXOS B. 3 – SOLUÇÃO DE VERMELHO DE FENOL 0,4 %	65
ANEXOS C – MEIO DE CULTURAS PARA MICOBACTÉRIAS	66
ANEXOS C. 1 – SOLUÇÃO DE VERDE MALAQUITA 2 %	66
ANEXOS C. 2 – MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN	66
ANEXOS C. 3 – MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN COM PNB	67
ANEXOS C. 4 – FLUXOGRAMA DO PREPARO DE LOWENSTEIN JENSEN COM PNB	
ANEXOS D – MEIOS DE CULTURA NA METODOLOGIA DO TSMP	67
ANEXOS D. 1 – MEIO DE TSMP	68
ANEXOS D. 2 – FLUXOGRAMA DO PREPARO DE MEIO PARA TSMP	69
ANEXOS D. 3 – ESCALA DE MC FARLAND	70
ANEXOS D. 4 – PREPARO DO INOCULO E SEMEADURA TSMP	71
ANEXOS E – COLORAÇÃO DE ZIEHL NEELSEN	72
ANEXOS E. 1 – SOLUÇÃO DE FUCSINA FENICADA A 0,3 %	72
ANEXOS E. 2 – SOLUÇÃO DE FENOL AQUOSO	73
ANEXOS E. 3 – SOLUÇÃO DE AZUL DE METILENO A 0,1 %	73
ANEXOS E. 4 – SOLUÇÃO DESCORANTE	73
ANEXOS E. 5 – TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN	73
ANEXOS F – PNB – SAT	74
ANEXOS F.1 – SOLUÇÃO ESTOQUE PARA PNB NO SAT	74
ANEXOS F.2 – PREPARO DE TUBOS CONTROLE E PNB-SAT	75
ANEXOS G – TSMA	
ANEXOS G.1 – FORMULA APROXIMADA POR FRASCO LIOFILIZADO DAS DROGAS PARA TSMA	75
ANEXOS H – ILUSTRAÇÕES	75
ANEXOS H. 1- ETAPAS DO SISTEMA AUTOMATIZADO BACTEC® MGIT™ 960	76
ANEXOS H. 2- SISTEMA AUTOMATIZADO BACTEC® MGIT™ 960	77
ANEXOS H. 3- TUBOS DE MIDDLEBROOK 7 H9 SUPLEMENTO PANTA E OADC	77

ANEXOS H. 4 –FORMAÇÃO SERPENTIFORME DE FATOR CORDA EM MEIO LÍQUIDO MIDDLEBROOK 7H9	78
ANEXOS H. 5 –COLÔNIAS DE <i>M. tuberculosis</i> EM MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN	78
ANEXOS H. 6 –TESTE DE SENSIBILIDADE MÉTODO AUTOMATIZADO	79

1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose tem como agente etiológico microrganismos do *Complexo Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. Canetti*, *M. caprae* e *M. microti*), sendo que a espécie mais importante, *M. tuberculosis*, foi isolada e identificada por Robert Koch em 1882.

Morfologicamente são bacilos retos ou ligeiramente curvos, com dimensões que variam de 0,2 a 0,6 μ por 1 e 10 μ , não formam cápsula, são imóveis e apresentam um tempo de geração, de cerca de 18 horas.

O *M. tuberculosis* possui características básicas como a transmissão por via aérea facilitada pela aglomeração humana, ambientes pouco arejados, maior tempo de contato com doente bacilífero (que elimina muitos bacilos pela tosse, espirro e fala) (FIUZA DE MELO et al., 2006).

A transmissão se inicia com a eliminação, pelo paciente portador de tuberculose pulmonar, de partículas pequenas, com tamanho de 2 e 10 μ , contendo o *Mycobacterium tuberculosis* chamadas de fomites, partículas núcleo ou gotículas núcleo de Wells que são capazes de alcançar os alvéolos pulmonares dos comunicantes (RILEY et al., 1962; SMITH; MOSS, 2005).

A maioria dos pacientes de tuberculose é acometida pela doença na faixa etária mais produtiva de suas vidas. A tuberculose continua um problema importante de saúde pública no mundo. Atualmente, encontra-se entre as dez principais causas de mortalidade mundial (WORLD HEALTH, 2006); o Brasil notifica 116.000 casos novos/ano (CANTALICE FILHO et al., 2007).

A Organização Mundial da Saúde destaca como principais causas para a gravidade da situação da tuberculose mundial, a desigualdade social, envelhecimento da população, migração humana e o advento da AIDS (KRITSKI AL et al., 2007). A tuberculose é a principal causa de morte entre as pessoas HIV positiva, sendo responsável por 50% das mortes, com base em dados da OMS (TERRIN, 2008). Atualmente o tratamento da tuberculose pulmonar é administrado em nível ambulatorial, reservando-se a internação aos quadros graves, como insuficiência respiratória, hemoptise e hepatite medicamentosa, por exemplo, (BRASIL, 1994).

A resistência natural às drogas ocorre por mutação espontânea e independe do contato prévio do bacilo com as drogas. Na população de células bacterianas sensíveis existe sempre uma pequena porcentagem de mutantes resistentes. Por esta razão, o tratamento da tuberculose não pode ser realizado com apenas uma droga, porque a maioria dos bacilos seria inibida ou morta e as células mutantes resistentes multiplicar-se-iam até se tornarem a maioria (BRASIL, 2005).

Portanto o tratamento quimioterápico da TB baseia-se em três características inerentes ao *Mycobacterium tuberculosis*: aerobiose estrita, multiplicação lenta e alta proporção de mutantes resistentes. De acordo com a lesão e a sua localização no hospedeiro o bacilo se comporta de maneira diferente, dependendo da disponibilidade de oxigênio. Durante a localização intracelular (macrófagos), o crescimento da micobactéria é lento pela baixa oferta de oxigênio, ação enzimática celular e o pH ácido. Os medicamentos que melhor atuam nestas condições são: Rifampicina (RMP), Pirazinamida (PZA), e o Etambutol (EMB) (FIUZA DE MELO et al., 2006). Quando a lesão é caseosa (fechada), o crescimento é intermitente, devido ao pH neutro ou ácido e a presença de necrose tecidual, que produz acúmulo de gás carbônico e ácido lático. A droga mais eficaz e rápida é a RMP, sendo a atuação da INH mais lenta e demorada. O crescimento apresenta-se rápido quando, com a liquefação do cáseo e o esvaziamento da lesão, o bacilo encontra na parede da cavidade pulmonar, local apropriado para sua multiplicação, tanto pelo pH neutro, como pela oferta de oxigênio e a presença de nutrientes que são suficientes, nestas condições. As drogas que melhor atuam neste nicho são: RMP, INH e a SM, que só agem em pH neutro (BRASIL, 2007).

Tratamentos irregulares, interrompidos antes da eliminação dos bacilos ou administração de doses inadequadas, permitem a ocorrência e crescimento de cepas resistentes aos medicamentos denominadas: resistência adquirida, pós-primária ou secundária (DALCOMO; ANDRADE; PICON, 2007). A transmissão de bacilos selecionados por resistência pós-primária para pacientes sem tratamento anterior é denominada resistência primária (FIUZA DE MELO et al., 2006).

A tuberculose multirresistente (TBMR) é definida no Brasil, como resistência *in vitro* a pelo menos rifampicina e isoniazida e a mais um ou mais dos medicamentos componentes dos esquemas terapêuticos. A disseminação das cepas multirresistentes (MR)

prejudica a eficácia dos esquemas terapêuticos (DIRETRIZES. . ., 2004).

Mais recentemente observa-se a ocorrência da tuberculose com bacilos excessivamente resistentes (TBXDR), definida como uma forma de TBMR com resistências adicionais às fluoroquinolonas e, pelo menos, a um dos anti micobacterianos injetáveis: como a amicacina, canamicina e capreomicina. Considerada pela OMS como uma importante ameaça no controle da tuberculose mundial, em alguns países a doença, assume contornos de uma autêntica pandemia (TEIXEIRA, 2007; VILARIÇA et al., 2008).

Entre 1995 e 1997, foi realizado um inquérito epidemiológico pelo Ministério da Saúde em treze Estados do Brasil. Isolados de *Mycobacterium tuberculosis* de 5.138 pacientes com TB pulmonar, com baciloscopia positiva foram utilizados para estabelecer o perfil de resistência aos medicamentos anti-TB no país. Destacados na tabela abaixo, resultados deste inquérito epidemiológico:

Tabela 1- I Inquérito Nacional da Percentagem da Resistência as Drogas Anti tuberculosas.

DROGA	RESISTÊNCIA PRIMÁRIA	RESISTÊNCIA ADQUIRIDA
RFA	0,2%	0,8%
INH	3,7%	6,7%
EMB	0,1%	0,2%
SM	2,5%	3,9%
MULTIRRESISTENCIA		
RFA+INH	0,8%	5,7%
RFA+ SM+ INH	0,3%	1,4%
TOTAL	9,2%	21,8%

Fonte: BRASIL, 2007.

O surgimento das drogas antituberculosas ocorreu nas décadas de 1940 e 1950. O Ministério da Saúde padronizou desde 1979 dois esquemas de tratamento.

O Esquema I (E1), que é destinado aos pacientes VT (virgens de tratamento) e o Esquema 3 (E3), indicado para casos de falência do E1.

O E1 denominado tratamento de primeira linha, são administradas às drogas: RFA, INH e PZA nos dois primeiros meses de tratamento (fase chamada de ataque), objetivando reduzir a morbidade, a transmissibilidade e a resistência adquirida pela redução da

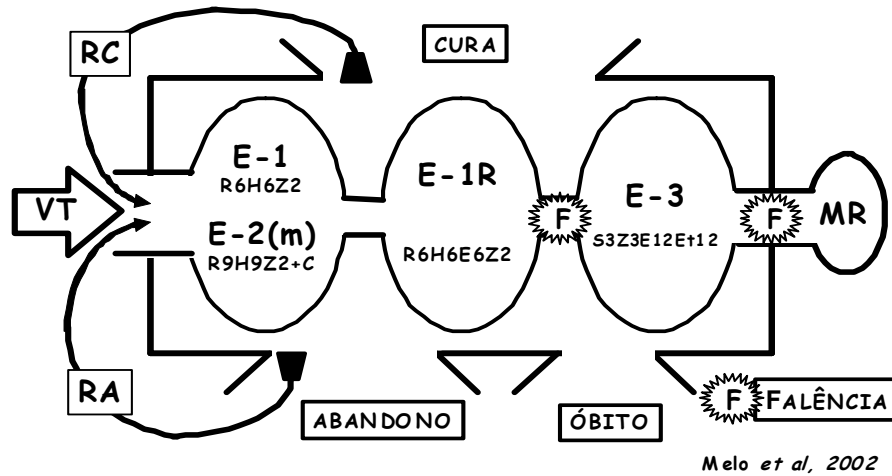
população bacilifera. A fase de manutenção, que se estende por quatro meses administra-se a RFA e a INH, objetivando eliminar os bacilos persistentes, proporcionando uma cura eficaz (DIRETRIZES. . ., 2004). Quando utilizado corretamente, sem abandono, a eficácia do EI é de 98%. Os 2% de falha corresponde à falência microbiológica (1,5%) e a necessidade de troca por efeitos colaterais 0,5% (BRASIL, 2007).

Um retratamento com o EI era indicado para casos de retorno positivo após abandono e para os recidivantes após cura que, em 1995, foi reforçado com o acréscimo do EMB, e denominado E1R. Sendo administradas, INH, RFA, PZA e EMB nos dois primeiros meses e INH, RFA e EMB nos quatro meses seguintes. Nos casos de meningoencefalite isolada ou associada a outras formas de TB, o Esquema II (EII) ou de segunda linha é utilizado. Sendo dois meses com RFA, INH e PZA e sete meses com RFA e INH estendido por nove meses (DIRETRIZES. . ., 2004).

O E III é indicado para pacientes que apresentam falência terapêutica dos esquemas 1 ou 1R. São administradas durante três meses: Estreptomicina (SM), Pirazinamida (PZA), a Etionamida (ETH) e o Etambutol (EMB), e por mais 9 meses a Etionamida (ETH) e o Etambutol (EMB) (Esquema 1). Apresenta uma taxa de cura em torno de 55 a 65%, com uma taxa de óbito de 2 a 8%, de falência de 7 a 25% e de abandono em torno de 18%. Além das drogas serem menos eficazes. A SM é usada via intramuscular. Em situações especiais via endovenosa diluída em soro fisiológico. Em pacientes idosos, temos o risco de nefrotoxicidade. O aumento da taxa de abandono deve-se ao uso de uma droga injetável por 3 meses a SM e os efeitos colaterais das demais.

O E III deve ser realizado em centros de referência para o tratamento da TB. Em casos de abandonos prévios, optar por sistema supervisionado (um profissional de saúde administra a medicação diariamente) (BRASIL, 2007).

O sistema de tratamento da tuberculose no Brasil



ESQUEMA 1- SISTEMA DE TRATAMENTO DA TUBERCULOSE NO BRASIL

E-1= esquema 1 de tratamento, E-2= esquema 2 de tratamento, E-1R= esquema de tratamento um reforçado, E-3=esquema 3 de tratamento, RA=reativação, RC=retorno pós-cura, VT=Virgem de tratamento, R=rifampicina, E=etambutol, S=estreptomicina, I=isoniazida, C=Cofazimina

Os pacientes não curados, com os esquemas de tratamento apresentados, são denominados portadores de TBMR. Em 2000 o Ministério da Saúde - MS validou o esquema alternativo com a associação de Amicacina (AM), Ofloxacina (OFX), Terizidon (TRZ), Etambutol (EMB) e Clofazimina (CLZ), administrados por 18 meses (DIRETRIZES. . ., 2004).

Apesar das drogas anti tuberculose combaterem eficazmente o microrganismo, elas podem ocasionar efeitos colaterais indesejáveis, seja pelo próprio princípio ativo ou pelos seus metabólicos (SALLES, 2004). Os fatores relacionados às reações adversas no tratamento da tuberculose são múltiplos, mas os principais determinantes destas reações são a doses administrada, horários de administração da medicação, idade, estado nutricional, co-infecção HIV, alcoolismo. Essas reações podem ser divididas em dois grupos: menores ou brandos que representam 5 a 20 % dos casos e não implicam em modificação imediata do esquema padronizado. E maiores ou graves representam 2 a 8 % dos casos e implicam na interrupção ou alteração do tratamento proposto (BRASIL, 2007).

Tabela 2 - Efeitos adversos brandos, pela utilização de drogas anti tuberculosas.

Efeito	Droga
Náusea, vômito, dor abdominal.	RFA, INH, PZA, OFX e AM
Artralgia ou artrite	PZA, INH e OFX
Cefaléia e mudança de comportamento (euforia, insônia, ansiedade e sonolência)	INH, EM B, OFX e TRZ
Neuropatia periférica	INH, EM B, AM, SM, OFX e TRZ
Suor e coloração de urina alterada	RFA
Prurido cutâneo	INH, RFA
Hiperuricemia	PZA, EMB
Febre	RFA, INH

(BRASIL, 2007)

Intolerância gástrica, manifestações cutâneas variadas e dores articulares são as reações adversas mais frequentemente descritas durante o tratamento com o E1. Os efeitos gastrointestinais (náuseas, vômitos, epigastralgia e dor abdominal) constituem o grupo de reações mais comuns e podem ser atribuídas a qualquer droga anti tuberculosa (SINGH, 1996).

Tabela 3 - Efeitos adversos graves, pela utilização de drogas anti tuberculosas.

Efeito	Droga
Exantemas	SM, RFA
Perda da audição	SM, AM
Vertigem e nistagmo	SM
Psicose, crise convulsiva, encefalopatia tóxica e coma	INH, TRZ OFX
Neurite ótica	EMB, INH
Hepatotoxicidade ¹ (vômitos, hepatite, alteração das provas de função hepática)	Todas as drogas
Trombocitopenia, leucopenia, eosinofilia, anemia hemolítica, agranulocitose, vasculite	RFA, INH
Nefrite intersticial	RFA, AM, SM
Rabdomiólise com mioglobulinúria e insuficiência renal	PZA
Anafilaxia	OFX, PZA

¹-Hepatotoxicidade: O paciente preferencialmente deve ser acompanhado em um centro de referência (BRASIL, 2007).

O laboratório de bacteriologia ocupa um papel importante no diagnóstico preciso da tuberculose, enquanto os exames clínicos e radiológicos auxiliam de modo indireto o diagnóstico (NOGUEIRA; ABRAHÃO et al., 2004). A baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) é considerada um exame simples, rápido e econômico e permite a identificação da principal fonte de infecção da TB (doentes bacilíferos). Desta maneira inicia-se o tratamento para interromper a transmissão da micobactéria. Esse procedimento é o mais importante do programa de controle da tuberculose (BRASIL, 2005). No entanto, a baciloscopia possui baixa sensibilidade (60% a 70%), sendo necessário de 5.000 a 10.000 bacilos por ml de escarro, para possibilitar esta forma de detecção. Assim podem ocorrer os resultados falsos negativos em espécimes paucibacilares. A baciloscopia pode apresentar resultado falso positivo, pela presença de bacilos mortos, que são evidenciados na coloração ZN (KENTE; KUBICA, 1985; KRITSKI et al., 2007). Por outro lado a cultura é mais sensível, e o crescimento ocorre com 10 a 100 bacilos por ml de escarro (THOMAS, 1989; YEARGER et al., 1967, BRASIL, 2005).

O meio de Lowenstein Jensen (LJ) continua indicado para uso rotineiro no Brasil e, é aprovado pela Organização Mundial de Saúde. Este meio permite isolar a maioria das micobactérias de interesse clínico, porém o resultado é extremamente demorado de três a oito semanas (KRITSKI et al., 2007). As Micobactérias não tuberculosas ou ambientais tendem a crescer com maior rapidez e é álcool-ácido resistentes (JAWETZ et al. 2004). O *Mycobacterium tuberculosis* cresce melhor a 37 °C em pH de 6,5. Os meios de cultura, Middlebrook 7H10 e o 7H11 são sólidos a base de Agar e também podem ser utilizados para antibiogramas como o de LJ (MARCONDES et al., 2006; BRASIL, 1994, 2005).

O meio de Middlebrook 7H9 é um meio líquido utilizado nos métodos automatizados para o cultivo e o antibiograma (BRASIL, 2005).

Nos meios sólidos o crescimento de micobactérias é melhor no meio de LJ e Ogawa-Kudo que são à base de ovo. No meio com Agar o desenvolvimento das colônias é rápido, mas nos caldos apresenta o menor tempo de crescimento (SOMOSKOVI, 1999).

Um sistema radiométrico conhecido como BACTEC AFB System (Becton Dickinson), desenvolvido em 1977, detecta o crescimento da micobactéria em caldo em 9 a 14 dias, para amostras do complexo *M. tuberculosis*, e sete dias para micobactérias atípicas. O sistema BACTEC 460 TB é o mesmo do radiométrico, porém, semi-automatizado,

proposto para o primo isolamento e realização do teste de sensibilidade a drogas. Destaca-se a presença de micobactéria pela concentração de gás carbônico radioativo induzido pelas micobactérias em meios de cultura específicos Middlebrook 7H9, com ácido palmítico marcado com carbono 14 (BECTON DICKINSON, 1985).

Outro sistema automatizado para detecção das micobactérias foi desenvolvido, utilizando procedimentos não radioativos. Em aproximadamente 14 dias é possível obter o diagnóstico microbiológico de amostras pulmonares, extrapulmonares, sangue e medula óssea. Exceto para amostras de sangue e medula óssea, são utilizados frascos específicos para a contenção de material. O cultivo é constituído por 10 ml de Caldo de Middlebrook 7H9 inoculado com 0,5 ml da amostra clínica preparado e incubado em atmosfera de gás carbônico em oxigênio sob vácuo. Este sistema é basicamente composto por um sensor colorimétrico separado do meio de cultura por membrana gás-permeável. Na presença de micobactérias, haverá produção de dióxido de carbono, como resultado da metabolização dos substratos do meio de cultura. Quando é produzido gás carbônico pelos microorganismos, o indicador deste gás muda de verde escuro para amarelo claro (CRUMP et al., 2003).

Metodologia semelhante foi desenvolvida pela Becton Dickinson, quando acoplou ao seu sistema de identificação, sem a detecção radioativa o Sistema Automatizado fluorescente. As amostras clínicas descontaminadas são inoculadas em Middlebrook 7H9 com sais de rutênio marcados com fluorocromo que emite luz em baixas concentrações de oxigênio. Uma célula fotoelétrica avalia, a cada hora, a luminescência dos tubos, que correspondem à quantidade de oxigênio consumido pelos microrganismos, registrando os resultados positivos. Estes resultados são confirmados por baciloscopia realizada do sedimento da cultura, corado pelo método de ZN, para detecção de BAAR, o fator corda é observado pela formação de agrupamento serpentina dos bacilos (BECTON-DICKSON, 1998).

Portanto o diagnóstico da doença é obtido pelo cultivo e identificação do *Mycobacterium tuberculosis* (FIUZA DE MELO et al., 2006).

O método das proporções (TSMP) é o mais utilizado para estabelecer o perfil de sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* aos antimicrobianos (CANETTI; RIST; GROSSET, 1963). Esse método tem como princípio a detecção da proporção de bacilos de

MTB resistentes presentes numa cultura bacteriana. O teste é realizado, em meio de LJ, adicionado com a droga capaz de inibir o desenvolvimento das bactérias sensíveis, mas não as das resistentes- “concentração crítica”. Para cada droga definiu-se a proporção esperada de mutantes resistentes numa população bacilar “proporção crítica”. O período de incubação é de 20 dias a 37 °C (BRASIL, 2005).

Os métodos automatizados para o isolamento das micobactérias foram também empregados na determinação da sensibilidade do *M. tuberculosis* a drogas. O grau de concordância para o Teste de Sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* do BACTEC 460® e do BACTEC 960® (TSMA) foi de 93,5% para os medicamentos de primeira linha (DIRETRIZES. . ., 2004).

O TSMA fornece resultados de sensibilidade de 4 a 13 dias. Esses testes são qualitativos e baseiam-se no crescimento do MTB nos tubos contendo droga testada em comparação aos tubos sem a droga. O crescimento é monitorado continuamente quanto ao aumento da fluorescência. Assim, é comparada a fluorescência no tubo com a droga ao tubo controle sem antimicrobiano. Os antibióticos usualmente testados nesse sistema são SM, INH, RMP, EMB (BECTON DICKINSON, 2005).

Após isolamento, verifica-se se as micobactérias crescem em meios com substâncias inibitórias como PNB (ácido para-nitrobenzóico). Este permite separar os membros do “Complexo” *M. tuberculosis* (MTC) das demais micobactérias não tuberculosas (MNT), que são resistentes, excetuando algumas estirpes de *M. kansasii*, *M. gastri* e *M. marinum*. O tempo de incubação, para este teste em meio sólido de LJ é de 20 dias como proposto por Tsukamura; Tsukamura, 1965 (GIAMPAGLIA, 2007; BRASIL, 2005). Atualmente, o TSMA já possibilita a realização desse teste, com redução significativa do tempo de incubação, 7 a 12 dias.

Opções como FASTPlaque TB-RIF®(Biotec Laboratories Ltd, Ipswich, Reino Unido); testes colorimétricos alamar Blue (Accumed, EUA) e E-test (AB biodisk, Suécia), tem sido propostas para detectar sensibilidade aos medicamentos anti TB , em fase de avaliação, não mostram uma relação prática de custo efetividade (PALOMINO et al., 2002; ALBAY et al., 2003).

Os testes diagnósticos de micobactérias, com a técnica de PCR e de micro arranjos do ADN, apenas Line Probe Assay®(INNO-LiPA RifTB- IMMUNOGENETICS N. V.,

Zwijndrecht, Bélgica) está disponível comercialmente e validado na Europa.

O teste da Luciferase, também tem sido avaliado, mas não há relato de sua reprodutividade (DIRETRIZES. . ., 2004). Neste teste uma amostra clínica é inoculada em meio Middlebrook 7H9 com fago contendo o gene da luciferase. O possível *Mycobacterium tuberculosis* na amostra clínica, é infectado pelo fago e o gene da luciferase produz luz, pelo acréscimo de luciferina no meio. Até o momento esta metodologia esta sendo utilizada apenas para a pesquisa (BARDAROV, 2003). A emergência de formas de micobactérias multirresistentes (MDR) e mais recentemente as excessivamente resistentes (XDR) despertaram atenção na saúde pública mundial (DALCOMO, 2007; VILARICA et al., 2008). Tais formas são problemáticas para a escolha e associação de drogas anti micobacterianas, assim como do tempo de administração. Dessa maneira, o conhecimento prévio e o estabelecimento, determinação do controle do perfil de sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas facilitariam a administração de tratamentos normatizado para portadores de germes resistentes às drogas propostas (BRASIL, 2007).

A literatura internacional, nesta área de conhecimento, demonstra melhor qualidade dos TSMA em relação ao TSMP (BEMER et al., 2002; SCARPARO et al., 2004; PIFFARDI et al., 2004). No Brasil, um estudo cooperativo entre entidades governamentais indicou a sua eficácia em relação ao TSMP (GIAMPAGLIA et al., 2007).

A aplicação do TSMA na rotina diagnóstica não é conhecida em serviço de referência ambulatorial terciário, isto é capaz de prestar serviços de alto grau de complexidade como o Instituto Clemente Ferreira (ICF), para casos de resistência do *M. tuberculosis*. O ICF é assim classificado pelo Controle Vigilância Epidemiológico (CVE) como nível três, por apresentar equipamentos de maior complexidade e recursos humanos especializados, para acompanhamento de casos complexos da TB. Realizar o diagnóstico diferencial de pneumopatias suspeitas de TB/TBMR. Administrar tratamentos quimioterápicos com esquemas especiais (exemplos: esquema TBMR e para hepatopatias). Propiciar intercambio técnico e científico para os profissionais da saúde (BRASIL, 2007). Desta maneira, o presente estudo aplicou a metodologia automatizada na detecção da sensibilidade de isolados clínicos recentes.

2 OBJETIVO

Comparação do sistema automatizado fluorescente (TSMA) e o método das proporções (TSMP) para a determinação de sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* a quimioterápicos em unidade de referência ambulatorial terciária.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Entre Agosto de 2007 e Março de 2008, foram estudadas amostras de micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes matriculados numa referência ambulatorial terciária de atendimento à tuberculose com diagnóstico inicial de tuberculose ativa. Os exames foram realizados para diagnóstico ou controle de tratamento da tuberculose. As amostras microbianas foram provenientes de 03 grupos de pacientes: 61 não tratados (NT), 35 retratados (RT) e 30 multirresistente (MR) de acordo com informações verbais¹ epidemiológicas do Serviço de vigilância epidemiológica do Instituto Clemente Ferreira.

Em seguida, a digestão e descontaminação do escarro foram realizadas pelo método de PETROFF (PETROFF, 1915). As culturas positivas foram submetidas ao teste de identificação presuntiva, com utilização do ácido p-nitrobenzóico (PNB-500 µg/ml) que caracteriza os membros do “Complexo” *M. tuberculosis* que são sensíveis, diferenciando das micobactérias (MNT). Este teste foi utilizado no SAT e no meio sólido (L-J) (BRASIL, 1994). Com o auxílio da coloração de Ziehl-Neelsen, o fator corda foi observado ao microscópio óptico comum em lâminas a partir das culturas positivas.

3.1 AMOSTRAGEM: COLETA DE ESCARRO

A amostra adequada de escarro provém da árvore brônquica, obtida após esforço de tosse. O material da faringe, por aspiração de secreções nasais, é inadequado para o diagnóstico microbiológico da TB (BRASIL, 1994). Os pacientes que apresentavam amostras clínicas para este estudo foram orientados para que o material obtido fosse adequado para análise.

As amostras foram colhidas em frascos plásticos, com tampa rosqueada e identificadas e a identidade do paciente não foi disponibilizada. Posteriormente o Serviço de vigilância Epidemiológica do Instituto Clemente Ferreira informou se a amostra era para diagnóstico ou acompanhamento do tratamento.

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

3. 2 PREPARO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

3. 2. 1 DIGESTÃO E DESCONTAMINAÇÃO

O método escolhido foi o de PETROFF (PETROFF, 1915). Tem o objetivo de destruir microorganismos da microbiota que se misturam com as possíveis micobactérias no material clínico, bem como liquidificar o escarro. Deste modo, as amostras foram transferidas para o tubo cônico e adicionadas da solução de hidróxido de sódio a 4%, em volumes iguais. Em seguida foi agitada e incubada a 37°C, mantendo-se homogeneizações por 15, 20 até no máximo 30 minutos de contato.

Foi adicionada água destilada no mesmo volume do tubo, com a finalidade de reduzir a viscosidade da suspensão e diluir o excesso de NaOH e a aumentar a eficácia de concentração da amostra pela centrifugação.

A suspensão foi neutralizada, gotejando a solução de ácido clorídrico 1,0 N contendo 0,004% de vermelho de fenol, até a obtenção da cor âmbar.

Centrifugada a 3000 g por 20 minutos. Foi desprezado o sobrenadante em recipientes a prova de respingos (BRASIL, 1994) (Anexo B).

3. 3 CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS

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

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

por uma luz indicativa e alarme. O resultado do teste foi registrado e impresso em dias, horas e minutos. (Anexo H1, H2 e H3)

Após a detecção de culturas positivas, os tubos eram analisados para confirmação da presença de BAAR pela coloração de ZN, fator corda (Anexo H4) seguido de isolamento e identificação das micobactérias (BECTON DICKINSON, 1998).

Foi realizado um subcultivo da cultura em caldo para o meio sólido de Lowenstein-Jensen, para posterior realização do teste de sensibilidade indireto aos antimicrobianos pelo método das proporções. O teste de sensibilidade no SAT foi realizado diretamente da cultura positiva líquida, do próprio sistema.

3. 4 BACILOSCOPIA

Uma alíquota da cultura crescida no SAT foi colocada em uma lâmina de microscopia comum, após secagem natural, e posterior fixação em bico de Bunsen. Foi procedida à coloração pelo método de Ziehl-Neelsen, conforme descrito, em Anexo E. A presença de fator corda foi observada nestas lâminas, em microscópio óptico comum, com objetiva de imersão (BRASIL, 1994).

3. 5 IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTERIAS

A identificação das micobactérias não tuberculosas (MNT) e dos membros do MTC ocorreu a partir de cultivo recente de colônias isoladas em meio solidificado. Foi feita uma suspensão utilizando o maior número de colônias possível, em tubo de ensaio contendo cerca de 10 pérolas de vidro e aproximadamente 0,5 ml de água destilada estéril. O tubo foi agitado em vortex por 20 a 30 segundos para homogeneizar a suspensão. Foram adicionados 0,5 ml de água destilada estéril, agitado novamente o tubo e mantido em repouso por 5 minutos. Gotejado lentamente a suspensão em tubo contendo 3ml de água destilada estéril, sendo obtido assim uma turvação correspondente ao tubo nº1 da escala de Mac Farland (Anexo D3). A partir desta suspensão padronizada, foi efetuada uma diluição 10^{-3} , da suspensão bacteriana. Semeado 0,1ml da suspensão bacteriana na diluição 10^{-3} , em tubo de LJ contendo ácido para-nitrobenzóico (PNB-500 μ /ml). (Anexo C3 e C4) Em

seguida o tubo foi incubado a 37 °C por 28 dias. A leitura foi efetuada, considerando 1% da proporção crítica. Os membros do *M. tuberculosis complex*, são sensíveis (não apresentam crescimento) no PNB, as MNT que cresciam, foram excluídas do estudo. (BRASIL, 2005). Da mesma maneira amostras de MTC, foram separadas nas culturas pelo SAT das MNT.

No Sistema BACTEC MGIT 960 o cultivo com Ácido para nitrobenzóico (PNB), baseia-se na sensibilidade do *M. tuberculosis* a 0,5 µg/ml de PNB. Foi preparada uma solução estoque do ácido para nitrobenzóico (PNB): 25 mg/ml. A partir desta solução foram preparados os tubos teste com PNB e tubos controle. (Anexo F1 e F2)

Assepticamente, foram pipetados 0,1 ml do isolado em meio líquido em 10 ml de água destilada estéril (diluição 1/100). Os tubos controle foram inoculados com 500 µg/ml da diluição 1/100.

Os tubos com PNB foram inoculados com 500 µg/ml da diluição 1/5 ou com a cultura em meio líquido.

Os tubos controle e PNB foram incubados no equipamento MGIT 960 e verificado diariamente a indicação de resultados.

Em cada uma das gavetas A, B, C do equipamento houve a indicação de tubo positivo (sinal +, luz vermelha), negativo (sinal -, luz verde) ou erro (ponto de exclamação! luz amarela). A gaveta que apresentou uma dessas indicações foi aberta.

A cepa foi considerada suscetível a 0,5 µg/ml de PNB quando o tubo contendo essa droga não positivou até dois dias após a positividade do tubo controle. Se o tubo com o PNB positivou neste período a cepa foi considerada resistente.

OBS: As cepas testadas ficaram armazenadas sob refrigeração até liberação dos resultados (GIAMPAGLIA, 2007).

3. 6 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICOBACTERIANOS

3. 6. 1 MÉTODO DAS PROPORÇÕES (TSMP)

A partir das culturas positivas em meio líquido, foram realizados repiques em meio sólido de Lowenstein-Jensen. Após o crescimento em meio sólido, foi realizado o método das proporções indireto, a partir de um isolado puro de *M. tuberculosis*.

O método descrito por Canetti; Riss; Grosset, 1963, foi aplicado para realizar os testes de sensibilidade das MTC, para os seguintes antibióticos: **SM**=Estreptomina, **INH**=Hidrazida, **RMP**=Rifampicina e **EMB**=Etambutol (BRASIL, 2005). (anexo D1 e D2)

Elaborou-se uma suspensão densa, do raspado de colônias de MTC em LJ, utilizando o maior número de colônias possível, em um tubo 20 x 150 mm contendo cerca de 10 pérolas de vidro e aproximadamente 0,5 ml de água destilada estéril. A suspensão foi homogeneizada em vortex por 20 a 30 segundos. Adicionou-se 0,5 ml de água estéril.

Homogeneizou-se novamente e o tubo foi mantido em repouso por 5 minutos, a temperatura ambiente. A concentração final foi obtida adicionando-se 3 ml de água destilada estéril até a obtenção da turbidez correspondente ao tubo n. 1 da escala de MacFarland.(Anexo D3) Em seguida foram realizadas, diluições decimais até 10^{-6} e semeado 0,1ml das diluições 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} nos tubos controle (sem droga). Nos tubos com as drogas somente as diluições 10^{-3} e 10^{-5} . (Anexo D4)

Os inoculos foram depositados nos tubos com LJ inclinados e mantidos a sua superfície horizontalmente em suporte de forma que o inóculo fosse distribuído homogeneamente sobre a superfície do meio. A tampa do tubo manteve-se frouxa por 24-48 horas para que o inóculo da superfície seca-se. Após este período os tubos foram incubados na posição vertical a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 dias. Anotado os resultados do teste quando ocorreu crescimento nos tubos-controle.(Anexos D1 e D2)

Após, o crescimento foi realizado o cálculo da porcentagem de bacilos resistentes da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Número de Colônias no Tubo com Drogas} \times 100}{\text{Número de Colônias no Tubo Controle}} = \% \text{ de Bacilos Resistentes}$$

Número de Colônias no Tubo Controle

Quando a porcentagem foi superior ou igual à proporção crítica pré estabelecida para cada droga, a amostra foi considerada resistente.

3. 6. 2 SISTEMA AUTOMATIZADO - TSMA

O BACTEC MGIT 960 SIRE KIT é um teste qualitativo com 4 a 13 dias de avaliação. Este teste é baseado na fluorescência emitida pelo crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* em tubo sem droga (tubo controle de crescimento) e outro com

a droga. Os resultados são interpretados automaticamente e determinadas às sensibilidades (sensível ou resistente).

Os reagentes do BACTEC MGIT 960 SIRE Kit contém um frasco com antibiótico desidratado, para cada uma das drogas; SM, INH, RMP e EMB. E oito frascos de suplemento que é um composto enriquecedor, contendo: albumina bovina, dextrose, catalase e ácido oléico.

Para a preparação do inóculo, um tubo MGIT de 7 ml positivo foi utilizado, a contar do primeiro dia da positividade (dia 0), até o limite máximo de 5 dias. Após este prazo o tubo positivo, foi objeto de subcultivo num tubo fresco MGIT de 7 ml contendo Suplemento de crescimento BACTEC MGIT 960.

Quando foi utilizado o tubo positivo no dia 1 ou 2, à suspensão de meio líquido foi inoculada sem diluição, no TSMA. Quando foi utilizado o tubo positivo no dia 3, 4 ou 5, foi homogeneizado e diluído 1 ml do meio líquido positivo em 4 ml de solução salina estéril (diluição 1:5). Esta suspensão diluída foi inoculada no TSMA.

Para a realização do TSMA foram identificados cinco tubos MGIT de 7 ml para cada isolado do teste. Identificado um tubo como CC (Controle de crescimento), e mais quatro tubos com SM, INH, RMP e EMB. Foram colocados os tubos em suporte apropriado.

Após a identificação foi adicionado, 0,8 ml de suplemento a cada tubo, e 100 µl da solução MGIT **SM** a 83 µg/ml para o tubo MGIT com identificação adequada. Pipetado, de forma asséptica, 100 µl da solução MGIT **INH** a 8,3 µg/ml para o tubo MGIT com identificação adequada. Pipetado, de forma asséptica, 100 µl da solução MGIT **RMP** a 83 µg/ml para o tubo MGIT com identificação adequada. Pipetado, de forma asséptica, 100 µl da solução MGIT **EMB** a 415 µg/ml para o tubo MGIT com identificação adequada. Não foram adicionados antibióticos ao tubo CC.

Para o tubo controle de crescimento, foram pipetados, 0,1 ml da suspensão e adicionados a 10 ml de soro fisiológico estéril, diluição 1:100. Homogeneizado, e inoculado 0,5 ml da suspensão de controle de crescimento 1:100 no tubo MGIT identificado como “CC”

Para os tubos contendo droga, foram pipetados, 0,5 ml de suspensão, para cada um dos tubos de fármacos (SM, INH, RMP e EMB). A concentração das drogas em cada tubo

está mais bem demonstrada na tabela a seguir:

Tabela 4- Concentração final das drogas anti tuberculosas, após preparação para o uso.

Droga	Concentração do da Droga após Reconstituição*	Volume Adicionado aos Tubos MGIT para Teste	Concentração Final nos Tubos MGIT
MGIT SM	83 µg/ml	100 µl	1, 0 µg/ml
MGIT INH	8,3 µg/ml	100 µl	0, 1 µg/ml
MGIT RMP	83 µg/ml	100 µl	1,0 µg/ml
MGIT EMB	415 µg/ml	100 µl	5,0 µg/ml

*Estes fármacos foram reconstituídos utilizando 4 ml de água estéril, para atingir as concentrações indicadas.

Os tubos foram fortemente fechados. Homogeneizados por completo através de inversão suave, três a quatro vezes.

Foi introduzido o conjunto AST (estante, tubo controle e tubo com drogas), no BACTEC MGIT 960, utilizando a função de entrada (conforme manual do equipamento).

O controle de contaminação foi realizado, estriando-se 0,1 ml da suspensão do microorganismo numa placa de Agar sangue. Em seguida, incubada entre 35 e 37 ° C.

A placa de Agar sangue foi analisada após 48h relativamente à presença de contaminação bacteriana. Quando o Agar sangue não apresentou crescimento, foi prosseguido o teste de sensibilidade. Quando a placa de Agar sangue apresentou crescimento, foi descartado o teste e repetido com uma cultura pura.

A estirpe *M. tuberculosis* ATCC 27294, foi empregada como bactéria de referência, nas duas metodologias testadas.

De todos os testes de sensibilidade foram confeccionadas lâminas e coradas pelo método de ZN para confirmação da presença de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) e observada à presença de fator corda.

O Sistema Automatizado BACTEC MGIT 960 detectou de 4 a 13 dias, o perfil de sensibilidade a drogas antimicobacterianas. Baseado no crescimento de isolado de *M. tuberculosis* num tubo que continha fármaco, comparado com um tubo isento de droga (controle de crescimento). O TSMA foi monitorado automaticamente até determinação do perfil de sensibilidade, através da fluorescência. A análise da fluorescência no tubo

contendo fármaco, comparativamente com a emitida no tubo de controle de crescimento, foi usada pelo equipamento para determinar os resultados da sensibilidade.(Anexo H6) Os resultados foram interpretados automaticamente pelo equipamento (Maryland, EUA 2009).

4 RESULTADOS

Das 146 amostras de culturas positivas, foram excluídas 14 amostras por suspeita de MNT e três por falta de identificação presuntiva através do crescimento em meio de cultura com agente inibidor PNB e 03 por não ter nenhuma informação epidemiológica para separação nos grupos de paciente NT (não tratados), RT (retratados) e MR (multirresistente). Portanto, foi estudado o perfil de sensibilidade de 126 isolados clínicos de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* avaliados pelos métodos das proporções - TSMP e automatizado, apresentaram os seguintes resultados: (Anexo A)

4.1 RIFAMPICINA – RMP

No grupo de pacientes **não tratados - NT**; 59 isolados (96,7%) apresentaram sensibilidade-S e 1(1,6%) resistência-R, nas duas metodologias avaliadas. No mesmo grupo 1 isolado (1,6%) apresentou R no TSMA e S no TSMP, $p=1000$ e $Kappa = 0,659$. No grupo de pacientes em **retratamento - RT**; 31 isolados (88,6%) apresentaram S e 2 (5,7%) R, nos dois métodos. Neste grupo 2(5,7%) apresentaram R no TSMA e sensibilidade no TSMP. Com $p=0,625$ e $Kappa=0,639$. No grupo de pacientes **multirresistentes-MR**; 1 isolado (3,3%) apresentou S e 28(93,3%) apresentaram R nas duas metodologias. Apenas 1 isolado (3,3%) apresentou S no TSMA e R no TSMP. Com $p=0,625$ e $Kappa= 0,651$. (Tabela 5).

Tabela 5 – Percentagem comparativa dos Testes de Sensibilidade de 126 isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* a Rifampicina pelos métodos TSMP e TSMA.

GRUPO			TSMA		Total
			S	R	
NT	TSMP	S	59(96. 7%)	1(1. 6%)	60(98. 4%)
		R	0(0%)	1(1. 6%)	1 (1. 6%)
		Total	59	2	61(100%)
RT	TSMP	S	31(88. 6%)	2(5. 7%)	33(94. 3%)
		R	0(0%)	2(5. 7%)	2(5. 7%)
	Total	31	4	35(100%)	
	TSMP	S	1(3. 3%)	0(0%)	1(3. 3%)
MR	TSMP	R	1(3. 3%)	28(93. 3%)	29(96. 7%)
		Total	2	28	30 (100%)

TS MP=teste de sensibilidade no método das proporções; TSMA=teste de sensibilidade pelo método automatizado para Rifampicina; NT= não tratado; RT = Retratamento; MR= multirresistente. S=Sensível. R= Resistente

4. 2 HIDRAZIDA-INH

No grupo **NT**; 51 isolados (83,6%) foram sensíveis-S e 3 (4. 9%) resistentes-R nas duas metodologias avaliadas. No mesmo grupo 6(9. 8%) apresentaram R no TSMA e S no TSMP e 1(1. 6%) apresentou S no TSMA e R no TSMP. Com $p=0. 125$ e $Kappa=0. 408$. No grupo **RT**; 26 isolados (74,3%) apresentaram S e 5 (14. 3%) R nas duas metodologias. No mesmo grupo 3 isolados (8. 6%) apresentaram R no TSMA e S no TSMP e 1 (2. 9%) apresentou S no TSMA e R no TSMP. Com $p=0. 625$ e $Kappa=0. 645$. No grupo **MR**; 26 isolados (86,7%) apresentaram R nas duas metodologias. No mesmo grupo 3 (10. 0%) apresentaram S no TSMP e R no TSMA e 1 (3,3%) apresentou S no TSMA e R no TSMP. Com $p=0. 625$ e $Kappa=0. 053$. (Tabela 6)

Tabela 6 - Percentagem comparativa dos Testes de Sensibilidade 126 isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* a Hidrazida pelos métodos TSMP e TSMA.

GRUPO			TSMA		Total
			S	R	
NT	TSMP	S	51(83.6%)	6(9.8%)	57(93.4%)
		R	1(1.6%)	3(4.9%)	4(6.6%)
	Total		52	9	61(100%)
RT	TSMP	S	26(74.3%)	3(8.6%)	29 (82.9%)
		R	1(2.9%)	5(14.3%)	6(17.1%)
	Total		27	8	35(100%)
MR	TSMP	S	0 (0%)	3(10%)	3(10%)
		R	1(3.3%)	26(86.7%)	27(90.0%)
	Total		1	29	30(100%)

TSMP=teste de sensibilidade no método das proporções; TSMA=teste de sensibilidade pelo método automatizado para Hidrazida; NT= não tratado; RT = Retratamento; MR= multirresistente. S=Sensível. R= Resistente

4.3 ESTREPTOMICINA-SM

No grupo **NT**; 53 isolados (86,9 %) foram sensíveis-S e 4 (6,6%) resistentes-R nas duas metodologias. No mesmo grupo, 4 (6,6%) apresentaram R pelo TSMA e S no TSMP. Com $p=0,125$ e $Kappa=0.635$. No grupo **RT**; 25 isolados (73,5 %) apresentaram S e 2 (5,9%) R nas duas metodologias. Neste mesmo grupo 7 (20,6%) apresentaram R pelo TSMA e S no TSMP. Com $p=0.016$ e $Kappa=0.296$. No grupo **MR**; 10 isolados (33,3%) apresentaram S e 13 (43,3%)R nos dois métodos. Apresentaram R no TSMA e S no TSMP 5 (16,7%) e 2 (6,7%) isolados apresentaram S no TSMA e R no TSMP. Com $p=0.453$ e $Kappa=0.533$. (Tabela 7)

Tabela 7 - Percentagem comparativa dos Testes de Sensibilidade 126 isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* a Estreptomicina pelos métodos TSMP e TSMA.

GRUPO	TSMP		TSMA		Total
			S	R	
NT		S	53(86. 9%)	4(6. 6%)	57(93. 4%)
		R	0(0%)	4(6. 6%)	4(6. 6%)
	Total		53	8	61
RT	TSMP	S	25(73. 5%)	7(20. 6%)	32(94. 1%)
		R	0(0%)	2(5. 9%)	2(5. 9%)
	Total		25	9	**34
	TSMA	S	10(33. 3%)	5(16. 7%)	15(50. 0%)
MR		R	2(6. 7%)	13(43. 3%)	15(50. 0%)
		Total		12	18

TSMP=teste de sensibilidade no método das proporções; TSMA=teste de sensibilidade pelo método automatizado para Estreptomicina; NT= não tratado; RT = Retratamento; MR= multirresistente. S=Sensível. R= Resistente; **no total era 35 neste grupo mais 01 amostra não apresentou resultado contaminado para esta droga.

4. 4- ETAMBUTOL – EMB

No grupo **NT**; 56 isolados (91,8%) foram sensíveis-S e 1 (1,6%) foi resistente-R nas duas metodologias. No mesmo grupo 4 (6,6%) apresentaram R no TSMA e S no TSMP. Com $p=0,125$ e $Kappa=0. 315$. No grupo **RT**; 32 isolados (91,4 %) foram S e 1 (2,9%) R nos dois métodos. Apresentaram R no TSMA e S no TSMP 2 (5. 7%) isolados. Com $p=0,500$ e $Kappa=0. 478$. No grupo **MR**, 13 isolados (44. 8%) apresentaram S e 8(27,6%) R nos dois métodos. No mesmo grupo 7 (24,1%) apresentou R no TSMA e S no TSMP e 1 (3,4%) apresentou S no TS MA e R no TS MP. Com $p=0. 70$ e $Kappa=0. 455$. (Tabela 8)

Tabela 8 - Percentagem comparativa dos Testes de Sensibilidade 126 isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* a Etambutol pelos métodos TSMP e TSMA.

GRUPO	TSMP		TSMA		Total
			S	R	
NT		S	56(91. 8%)	4(6. 6%)	60(98. 4%)
		R	0	1(1. 6%)	1(1. 6%)
	Total		56	5	61
RT	TSMP	S	32(91. 4%)	2(5. 7%)	34(97. 1%)
		R	0(0%)	1(2. 9%)	1(2. 9%)
	Total		32	3	35
MR	TSMP	S	13(44. 8%)	7(24. 1%)	20(69. 0%)
		R	1(3. 4%)	8(27. 6%)	9(31. 0%)
	Total		14	15	**29

TSMP=teste de sensibilidade no método das proporções; TSMA=teste de sensibilidade pelo método automatizado para Etambutol; NT= não tratado; RT = Retratamento; MR= multirresistente. S=Sensível. R= Resistente; ** No total 30 pacientes nos mais a amostra apresentou resultado contaminado para esta droga

Quadro 1 – Comparativo do tempo necessário para o isolamento do *Mycobacterium tuberculosis*, em LJ e no SAT, e o tempo por TSMP e TSMA.

Metodologias de Cultivo	Tempo Médio
Culturas em LJ	21-32 dias
Culturas no Sistema Automatizado (SAT)	8-12 dias
Teste de Sensibilidade	Tempo Médio
Método das Proporções (TSMP)	28 dias
Sistema Automatizado (TSMA)	7-12 dias

SAT=Sistema Automatizado (BACTEC-960®-MGIT™), LJ= Lowenstein Jensen, TSMP=teste de sensibilidade no método das proporções; TSMA=teste de sensibilidade pelo método automatizado (BACTEC-960®-MGIT™KIT SIRE)

A estirpe *M. tuberculosis* ATCC 27294, foi empregada como bactéria de referência, nas duas metodologias testadas, apresentou sensibilidade esperada para SM, INH, RMP e EMB, e crescimento normal no tubo controle (sem utilização de drogas) (BRASIL, 2005).

5 DISCUSSÃO

O Brasil encontra-se entre os 22 países com maior carga de casos anuais notificados, responsáveis por 80% dos casos de tuberculose no mundo (WORLD HEALTH, 2006), ocupando o 15º lugar (VIEIRA; GOMES, 2008). Recentemente o Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, responsável pelo controle e vigilância da TBMR no país, notificou entre 2000 e 2004 um total de 2.053 casos, quase 65% na região sudeste (BRASIL, 2007). Esta incidência vem aumentando no país, e esta claramente relacionada ao abandono e irregularidade no uso das drogas mesmo com o avanço na aplicação do tratamento supervisionado. O Ministério da Saúde acrescentará o Etambutol, como quarto anti-micobacteriano na fase de ataque, isto é nos dois primeiros meses de tratamento do esquema de primeira linha usado no país (FIUZA DE MELO, 2009; SAVIOLI, 2009).

Tal medida requer reavaliação dos métodos diagnósticos usados no controle da doença, que é baseada no exame baciloscópico. Atualmente, além de detectar o microrganismo é importante conhecer o perfil de sensibilidade do microrganismo às drogas anti-micobacterianas. Os testes de sensibilidade às drogas eram aplicados aos casos mais complicados, estudos amostrais para conhecer o perfil de resistência às drogas e, de certa forma, como parâmetro de qualidade dos Programas Nacionais de Controle da TB, agora uma necessidade crescente em grupos de riscos para MDR (ex. contato domiciliar, indivíduos com perfil de não adesão ao tratamento, intolerância medicamentosa, etc. . .), que a cada dia se ampliam e tendem a se tornar um problema geral e não particularizado (DIRETRIZES. . . , 2004).

A necessidade de reduzir o tempo e aumentar a sensibilidade dos exames, para diagnóstico da tuberculose pulmonar e principalmente definir seu perfil de resistência, são prioridades em laboratórios de referência, para evitar regimes inadequados, diminuir o custo do tratamento, o tempo dos sintomas, da transmissão além do sofrimento humano. Em situações especiais de imunodeprimidos, tais como diabéticos, transplantados de órgãos e também os co-infectados TB/HIV, apresentam maiores riscos de insucesso nos tratamentos. Devem ser monitorada clínica e laboratorialmente, e sua evolução terapêutica acompanhada por coortes para avaliar o rendimento do E1 (cura, falência, abandono e

recidivas), para possíveis necessidades de alterações do tratamento (FIUZA DE MELO et al., 2006).

Em 2002, o Ministério da Saúde, passa a recomendar a realização de cultura e testes de sensibilidade para todos os pacientes com indicação de retratamento, tendo estimulado a introdução destes exames em Laboratórios Centrais nos Estados da União (BRASIL, 2002).

No Brasil o teste mais utilizado é o método das proporções em meio sólido de Lowenstein-Jensen, porém este teste demora em média 28 dias, considerando o repique a partir de cultura em meio líquido, cerca de 50 dias, um tempo muito longo e custoso para definir o esquema adequado.

Obtivemos os resultados do TSMA entre 7 e 12 dias e no TSMP em 28 dias. GIAMPAGLIA, 2007 constatou uma média de 6,9 dias quando utilizou o TSMA, BEMER et al. 2002, obteve em 6,5 e 7,0 dias respectivamente e Barreto, 2003 obteve o resultado do TSMP em 3 semanas e TSMA em 7 dias. Esta redução do tempo esta relacionada à utilização do meio líquido Midlebrook 7H9.

Sendo o Instituto Clemente Ferreira (ICF), serviço de referência ambulatorial terciária isto é capaz de prestar serviços de alto grau de complexidade para TB (BRASIL, 2007), tendo registrado nos anos de 2005 e 2006, uma média de 650 pacientes/ano de tuberculose, sendo 540 de tuberculose pulmonar não tratada, com 130 (24 %) pacientes com retratamento (Nota¹). A estes acrescentando cerca de 10 % de casos pulmonares com resistência única ou múltipla primária entre os casos referenciados de risco para a multirresistência, com morbidades associadas e os contatos de pacientes MR Assim cerca de 40% desses casos beneficiaram-se com o teste de sensibilidade a anti-micobacterianos. Desta maneira a avaliação da metodologia automatizada oferece otimização do serviço público pela indicação e controle de infecções complicadas e a sua disseminação pelas amostras bacterianas multirresistentes. A avaliação da metodologia automatizada é de suma importância neste serviço.

Atualmente a maior importância a ser avaliada no perfil de sensibilidade é a resistência a RFA e ISN, que não podem ser consideradas resistência natural. Podendo acontecer somente por uso anterior de drogas (BRASIL, 2005).

Os resultados da TSMA concordaram com a TSMP para a Rifampicina nos três

grupos de pacientes. Este fato pode estar relacionado com a taxa de mutação de 10^{-8} para esta droga, a menor para estas bactérias, diminuindo a sua diversidade no hospedeiro. Esta concordância foi observada no Brasil por Giampaglia et al., 2007 no Chile por Piffardi et al., 2004 e Scarparo et al. 2004 na Itália.

A Hidrazida-INH apresentou no grupo NT, discrepância e pode estar relacionada com o tempo que esta droga vem sendo utilizada para o tratamento da TB, apresentando maior número de lócus de resistência (CARDOSO, 2007). No grupo RT, apresentou uma boa concordância entre as metodologias, mas não no grupo MR. Este achado deve-se a maior resistência encontrada no TSMA. A resistência à INH é a maior de origem primária encontrada no país. No grupo MR a resistência primária somou-se a adquirida aumentando a porcentagem de resistência no grupo. A resistência da INH está em 6% no país atualmente, sendo mais bem avaliada em meio líquido por ser mais sensível do que em meio sólido, revelando a eficácia do sistema automatizado. O que justifica a maior divergência a favor do sistema automatizado. A discrepância dos resultados das metodologias nos grupos RT e no MR pode estar relacionada à administração de 10 mg/Kg ao dia, utilizada no Brasil, contra 3 a 5 mg/Kg ao dia, em outros países. Isto contribui para a resistência a drogas (CARDOSO, 2007). Uma amostra que apresentou resistência no TSMP e sensibilidade no TSMA nos três grupos deste estudo (NT, RT e MR), indica possibilidade da limitação técnica.

A sensibilidade de micobactérias à estreptomicina apresenta maior dificuldade de avaliação por ser pouco reprodutiva. Esta droga em concentração sub-ótima pode apresentar falsa resistência microbiana independente da metodologia utilizada. (GIAMPAGLIA, 2007). No grupo NT, as metodologias apresentaram boa concordância, ao contrário nos grupos RT e MR. *M. tuberculosis* possui taxa de mutação natural de 10^{-4} frente à estreptomicina (GIAMPAGLIA, 2007; PIFFARDI et al., 2004).

Piffardi et al., 2004, obtiveram a concordância de 97,4% para INH entre a TSMA e TSMP utilizando-se de 275 isolados de *M. tuberculosis*, obtidos no Chile entre 2001 e 2003.

As divergências entre as metodologias foram maiores na avaliação com a hidrazida e estreptomicina, este fato pode ser relacionado ao uso destas drogas desde a década de 50 (CARDOSO et al., 2007).

O Etambutol apresentou índice Kappa 0. 315 no grupo NT, e 0. 478 no grupo RT e 0.

455 no grupo MR. Não há justificativa para a ausência de reprodutividade da mesma metodologia. Sabe-se que a resistência parcial ou “borderline” pode não levar a reprodutividade dos resultados no mesmo laboratório e entre laboratórios (ALCAIDE et al., 1997). Especula-se que a amostra bacteriana utilizada possui baixo nível de resistência, ou existência de sub populações de micobactérias resistentes e sensíveis no mesmo inóculo (PIERSIMONI et al., 2006). Mutações no gene *embB* estão associados com a resistência as drogas em alta concentração. Isolados de resistência com baixo nível de concentração da droga não apresentam mutação do gen *embB* (ALCAÍDE et al.,1997; PIFFARDI et al., 2004; GIAMPAGLIA, 2007)

Giampaglia, 2007 validou a TSMA em três laboratórios de referência no sudoeste do Brasil. Comparou TSMA com Sistema semi-automatizado radiométrico -B460 e TSMP e também com o método do coeficiente de resistência-RRM. Oitenta e oito isolados clínicos do Instituto Adolfo Lutz com base em dois ou mais resultados concordantes entre os métodos B460, o TSMP e o RRM, foram comparados com o TSMA. As taxas de concordância foram de 95,2% com o B460; de 96,6% com TSMP e de 93,4% com o RRM. A concordância entre o TSMA e o TSMP para I foi ótima, 100%.

As discrepâncias entre o presente estudo e o de Giampaglia, 2007 e Piffardi et al., 2004 se deve pelo uso de amostras bacterianas clínicas e não de cepas selecionadas de bacterioteca.

Diversos fatores podem interferir nos resultados entre os estudos. A contaminação por micobactérias não tuberculosas no material clínico apontariam falsamente o consumo de oxigênio no sistema automatizado. PIFFARDI et al., 2004 ressalta maior resistência das cepas no TSMA em relação ao TSMP e propõe mais estudos dos fatores interferentes. A continuidade da observação laboratorial em comparação com a evolução clínica após introdução de esquemas adequados pode contribuir para a eficácia destas análises, no caso são facilitadas pela integração da assistência e do laboratório num mesmo serviço.

O TSMA foi realizado com concentrações críticas das drogas e ligeiramente inferiores às utilizadas no TSMP, para evitar falsa sensibilidade (BECTON DICKINSON, 2005)

A utilização do TSMA é mais segura, visto que os reagentes encontram-se padronizados e disponíveis para comercialização. Já o TSMP não possui insumos

disponíveis no mercado, devendo ser preparado no laboratório.

Culturas fora da fase log de crescimento e cepas mistas de culturas, assim como a concentração do inóculo, também podem afetar os resultados (GIAMPAGLIA et al., 2007).

Mitchison, 2005 relata a comparação de resultados entre 16 laboratórios de referência em micobacteriologia no mundo e a disparidade de resultados encontrados quanto à resistência de drogas anti-micobacterianas.

A metodologia do TSMA contribuiu na eficácia do serviço do ICF adicionado ao método automatizado fluorescente (MA), previamente implantado, no cultivo de micobactérias tuberculosas que reduziu o tempo de cultura em média de 34,7 para 10,5 dias em média (ALMEIDA et al., 2005). Este conjunto diagnóstico aplicado na rotina do ICF permitiu contribuir mais eficazmente o controle da tuberculose.

6 CONCLUSÕES

1. O uso do Teste de Sensibilidade pelo Método Automatizado (TSMA) demonstrou maior rapidez, na detecção de cepas resistentes as drogas anti tuberculosas, do que o Teste de Sensibilidade pelo Método das Proporções.
2. O TSMA detectou maior número de cepas de micobactérias resistentes aos antibióticos do que no TSMP.
3. A sensibilidade das cepas de micobactérias do complexo MTB á Rifampicina apresentou boa concordância de resultados entre TSMA e TSMP.
4. A sensibilidade das cepas de micobactérias do complexo MTB à Estreptomicina e Etambutol não apresentaram boa concordância entre os resultados do TSMA e TSMP.
5. Houve boa concordância de resultados da sensibilidade das micobactérias a INH entre os TSMA e TSMP no grupo de pacientes em retratamento (RT).
6. O conjunto de resultados obtidos entre os TSMA e TSMP na avaliação da sensibilidade de amostras de micobactérias CMT indicaram que a rapidez e o custo da metodologia automatizada favorece sua implantação no Centro de Referência Terciário para tratamento da Tuberculose pulmonar na cidade de São Paulo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS²

ALBAY, A.; KISA, O.; BAYLAN, O.; DPGMAMCI, L. The evaluation of FASTPlaque TB™ for the rapid diagnosis of tuberculosis. **Diagn. Microbial. Infect. Dis.**, v. 46, p. 211-15, 2003.

ALCAIDE, F.; PTYFFER, G. E.; TELENTI, A. Role of *emb B* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p. 2270-2273, 1997.

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

BARDAROV, S. Jr.; DOU, H.; EISENACH, K.; BANAIIEE, N.; YA, S.; CHAN, J. et al. Detection and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 45, p. 53-61, 2003.

BARRETO, A. M. W. et al. Evaluation of indirect susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to the first-and second-line, and alternative drugs by the newer MB/ BacT system. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 827-830, 2003.

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

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

BECKTON DICKINSON. Bula do *kit* para Sire no BACTEC-960®-MGIT™, 2005. Disponível em: <[http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8008200\(0307\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8008200(0307).pdf)>. Acesso em: 3 Out., 2009.

² De acordo com:

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

BECKTON DICKINSON. Manual do Usuário. BACTEC-®-MGIT™960 SYSTEM. São Paulo: Beckton, 1998.

BEMER, P. et al. Multicenter Evaluation of Fully Automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, p. 150-154, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Helio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994. p. 37-43, 135.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Helio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da Tuberculose: Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço**. 5 ed. Rio de Janeiro, 2002. p. 101-102.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Em Saúde. Centro de Referência Prof. Helio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 3 ed. Rio de Janeiro, 2005. p. 47, 135,59-63.

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

CANETTI, G; RIST, N.; GROSSET, J. Méasure de la sensilité du bacile tuberculeux aux drougues antibacilaires par la méthode dès proportions. **Rev. Tuberc. Pneumol.**, v. 27, p. 217, 1963.

CARDOSO, R. F.; CARDOSO, M. A.; LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N. ; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. C.; MELLO, F. F.; HIRATA, M. H. Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 59-61, 2007.

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

1987-1990, 2003.

CANTALICE FILHO, J. P.; SANT'ANNA, C. C.; BÓIA, M. N. Aspectos clínicos da tuberculose pulmonar em idosos atendidos em hospital universitário do Rio de Janeiro. **J. Bras. Pneumol.**, p. 700, 2007.

DALCOMO, M. P.; ANDRADE, M. K. N.; PICON, P. D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, p. 1-12, 37, 2007. Supl. 1.

DIRETRIZES brasileiras para tuberculose. **J. Bras. Pneumol.**, v. 30, n. 1, p. 6-36, 2004.

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

FIUZA DE MELO F. A.; AFIUNE J. B., et al., Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. **Rev. da Sociedade Brasil. de Méd. trop.**, v. 36, p. 28, 2003.

FIUZA DE MELO F. A. et al., The Brazilian experience controlling TB multi-drug resistance. Abstracts of guest lectures. Europ Soc Mycobactrol, 30 th. Annual Congres, Porto-Portugal., p. 26-27, 2009.

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

GIAMPAGLIA, C. M. S.; MARTINS, M. C.; OLIVEIRA VIEIRA, G. B.; VINHAS, S. A.; SILVIA TELLES, M. A.; PALACI, M.; MARSICO, A. G.; HADAD, D. J.; MELLO, F. C. Q.; SOUZA FONSECA, L.; KRITSKI, A. Multicentre evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, v. 11. p. 986-991, 2007.

JAWETZ, E. M. D.; JOSEPH, L. M.; EDWARD, A. A.; GEO, F. B.; JANET, S. B.; NICHOLAS, L. O. **Microbiologia Médica**. E.U.A., Editora MC GRAW HILL, 2004. Cap. 25, p. 223.

KENT, P. T.; KUBICA, G. P. Identification test techniques. In: CENTERS FOR DISEASE CONTROL, ATLANTA. **Public Health Mycobacteriology: A guide for the Level III Laboratory**. Atlanta, 1985. p. 207.

KOCH, R. Die aetiologie der Tuberculose. **Berliner klinische Wochenschrift: Organ für praktische Aerzte**. Chapter 15, p. 221-230, 1882.

KRITSKI, AL.; VILLA, T. S.; TRAJMAN, A.; SILVA, J. R. L.; MEDRONHO, R. A.; NETTO, A. R. Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas. **Rev. Saúde Pública**, v. 41, n. 1, p. 9-14, 2007.

MARCONDES, A.G. et al. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de agar Middlebrook 7h11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. **Braz. J. Vet Res. Anin. Sci.**, v. 43, n. 3, p. 363, 2006.

MITCHISON, D. A. Drug. Resistance in tuberculosis. **Eur. Resp. J.**, v. 25, n. 2, p. 376-9, 2005.

OPLUSTIL, C. P.; TEIXEIRA, S. R.; OSUGUI, S. K. ;MENDES, C. F. Impacto da automação no diagnóstico de infecções por micobactérias. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n. 3, p. 167-173, 2002.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.;GUERRA, H.; SWINGS, J.;PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 2720-2, 2002.

PIERSIMONI, C. O. A.; BENACCHIO, L.; SCARPARO, C. Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: the automated nonradiometric systems. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 20-28, 2006.

PETROFF, S. A. A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. **J. Exp. Méd.**, v. 21, p. 38-42, 1915.

NOGUEIRA, P. A.; ABRAHÃO, R. M. C. M.; MALUCELLI, M. I. C. Baciloscopia de escarro em pacientes internados nos hospitais de tuberculose do Estado de São Paulo. **Rev. Brás. Epidemiol.**,v. 7, n. 1,p. 54, 64, 2004.

PIFFARDI, S. F.; LUNA, A. H.; SAKURADA, A. Z.; LEPE, R. L. Evaluación comparativa del método automatizado BACTEC MGIT 960 con el método de las proporciones para determinar susceptibilidad a drogas antituberculosas en Chile. **Rev. Chil. Enf. Respir.**, v. 20, p. 139-143, 2004

RILEY, R. L.; MILLS, C. C.; O'GRADY, F.; SULTAN, L. U.; WITTSTADT, F.; SHIVPANI, D. N. Infectiousness of air from a tuberculosis ward. **Am. J. Respir. Dis.**, p. 511-525, 1962.

SALLES, C. L.; CONDE, M. B.; HOFER, C.; CUNHA, A. J.; CALÇADA, A. L.; MENEZES, D. F. Defaulting from anti-tuberculosis treatment in a teaching hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 8, n. 3, p. 318-322, 2004.

SAVIOLI, M. T. G.; NETO, J. I.; ALMEIDA, E. A.; MORRONE, N.; ORTEGA, M. T.; MELO, F. A. F.; RODRIGUES, D. S. Tuberculosis with extensive resistance to drugs in a TB reference center in São Paulo, Brazil. In: CHEST, 2009, San Diego, CA. **Resumo...** São Paulo: [s.n.], 2009.

SCARPARO, C.; RICORDI, P.; RUGGIERO, G.; PICCOLI, P. Evaluation of the Fully Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide, Streptomycin, Isoniazid, Rifampin, and Ethambutol and Comparison with the Radiometric BACTEC 460 Method. **J. Clin. Microb.**, p. 1109-1114, 2004.

SMITH P. G.; MOSS A. R. Epidemiology of Tuberculosis. In: AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. **Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control.** Washington: Edited by Barry R. Bloom, 2005. p. 47.

SINGH, J.; GARG, P. K.; TANDON, R. K. Hepatotoxicity due to antituberculosis therapy. Clinical profile and reintroduction of therapy. Clinical profile and reintroduction of therapy. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 22, n. 3, p. 211-214, 1996.

SOMOSKOVI, A.; MAGYAR, P.; Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with MB redox, Lowenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1366-9, 1999.

TEIXEIRA, G. M.; XDR-TB Uma grave e emergente ameaça à saúde pública - **Rev. Bras. Pneumol. Sanit.**, v. 15, n. 1, 2007.

TERRIN, S. Brasil registra 80mil novos casos de Tuberculose por ano **Rev. Infecto Atual.**, ed. 48, dez./jan., 2008.

THOMAS, D. M.; Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory techniques applicable in developing countries. **Rev. Inf. Dis.**, v. 2, n. 2, p. 471-478, 1989

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

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

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

YEARGER, H. J. R.; LACY, J.; SMITH, L. R.; LEMAISTRE, C. A. Quantitative study of micobacterial population in sputum and saline. **Am. Rev. Respir. Dis.**, p. 95-99, 1967.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: surveil-lance, planning, financing.** Geneva: WHO, 2006. p. 250.

ANEXOS

ANEXO A - Resultados comparativos da sensibilidade aos anti micobacterianos das amostras de paciente VT, RT e MR pelas metodologias TSMP E TSMA.

			TSMP				TSMA			
			S	I	R	E	S	I	R	E.
1	41111-1919-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
2	41335-1941-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
3	40622-1976-07	Não MR	S	R	R	S	S	R	R	S
4	40684-2027-07	MR	R	R	R	S	R	R	R	R
5	41375-2031-07	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S
6	37144-2065-07	MR	S	R	R	R	S	R	R	R
7	41394-2067-07	VT	S	S	S	S	S	R	S	S
8	35001-2098-07	Não MR	S	S	S	S	R	R	R	S
9	41402-2130-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
10	41335-2198-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
11	41478-2254-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
12	35100-2269-07	MR	S	R	R	S	S	R	R	S
13	34182-1980-07	MR	S	S	R	S	S	R	R	R

ANEXO A - CONTINUAÇÃO										
			TSMF				TSMR			
			S	I	R	E	S	I	R	E
14	33957-1951-07	MR	R	R	R	R	S	R	R	R
15	38582-2091-07	MR	S	R	R	S	R	R	R	S
16	41473-2271-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
17	41403-2128-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
18	41486-2282-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
19	38471-2301-07	MR	S	S	R	S	S	R	R	S
20	41475-2305-07	VT	S	S	S	S	S	R	S	S
21	35663-1943-07	Não MR	S	S	S	S	S	R	S	R
22	40702-2172-07	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S
23	41497-2323-07	MR	S	R	S	S	S	R	S	S
24	34058-2173-07	Não MR	S	R	S	S	R	R	S	R
25	41504-2333-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
26	42136-432-08	MR	S	R	R	S	R	R	R	R

ANEXO A - CONTINUAÇÃO										
			TSMP				TSMA			
			S	I	R	E	S	I	R	E
52	40773-688-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
53	38429-856-07	MR	S	R	R	S	S	R	R	S
54	38614-790-07	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S
55	40794-762-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
56	40802-755-07	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S
57	40674-530-07	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S
58	39813-819-07	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S
59	40446-811-07	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S
60	40841-906-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
61	40836-889-07	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S
62	40839-912-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
63	40864-948-07	MR	S	R	R	R	S	R	R	S

ANEXO A - CONTINUAÇÃO										
			TSMP				TSMA			
			S	I	R	E	S	I	R	E
112	41963-3313-07	VT	S	R	S	S	R	R	R	S
113	41980-3357-07	MR	R	R	R	R	R	R	R	R
114	det. -3350-07	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S
115	Det. -3253-07	Não MR.	R	S	S	S	R	S	S	S
116	42047-3468-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
117	40481-3497-07	Não MR.	S	S	S	S	S	S	S	S
118	Det. -3517-07	MR	R	S	R	R	R	R	R	R
119	42100-3536-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
120	40469c-3405-07	MR	R	R	R	S	R	R	R	R
121	42115-3574-07	VT	S	S	S	S	S	S	S	S
122	Det. -3569-07	Não MR.	S	S	S	S	S	S	S	S
123	36338-3506-07	MR	R	R	R	S	S	R	S	S
124	42013-3571-07	VT	S	S	S	S	S	R	S	S

ANEXO A - CONTINUAÇÃO										
			TSMP				T SMA			
			S	I	R	E	S	I	R	E
125	42148-37-08	VT	S	S	S	S	S	R	S	S
126	Det. 59-08	Não MR	S	S	S	S	S	S	S	S

Pront. lab. ano = Prontuário número do laboratório e ano; Det. = Detento; S= Estreptomomicina; I=Isoniazida; R= Rifampicina; E= Etambutol; TS/LJ=teste de sensibilidade no método das proporções; T SMA=teste de sensibilidade pelo método automatizado VT= Virgem de Tratamento; não MR=Tratado não multirresistente; Tratado MR= tratado multirresistente. S = Sensível e R= Resistente.

ANEXO B – MÉTODO DE PETROFF PARA DESCONTAMINAÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS

ANEXO B. 1 - SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO A 4% (SOLUÇÃO A)

Hidróxido de sódio	4,0 g
Água destilada	100 ml

Foi dissolvido 4,0 g de hidróxido de sódio em 100 ml de água destilada.

Autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

ANEXO B. 2 - SOLUÇÃO DE HCL 1,0 N CONTENDO 0,004% DE VERMELHO FENOL (SOLUÇÃO B)

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

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

ANEXO B. 3 - SOLUÇÃO DE VERMELHO FENOL A 0,4% (SOLUÇÃO C)

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

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

ANEXO C - MEIO DE CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS

ANEXO C. 1 - SOLUÇÃO DE VERDE MALAQUITA 2%

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

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

Filtrado, acrescentado o restante da água destilada fervente.

Esterilizado a 110 °C por 30 minutos ou 120 °C por 15 minutos.

ANEXO C. 2 - MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN

Foram utilizados para o preparo do meio de Lowenstein-Jensen, os seguintes componentes:

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

-Em um balão volumétrico, foram dissolvidos em água destilada os sais e asparagina exceto o verde malaquita a 2 %.

-A seguir foi adicionada a glicerina bidestilada.

-Esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos.

-Esfriado o balão em água corrente, sob agitação.

-Os ovos foram lavados cuidadosamente, com auxílio de escova, água e sabão.

-Os ovos foram quebrados, um a um, separadamente, em Becker estéril, sendo observada a qualidade dos mesmos.

- Transferidos para um copo estéril de liquidificador, e a seguir homogeneizados e

adicionados ao meio base.

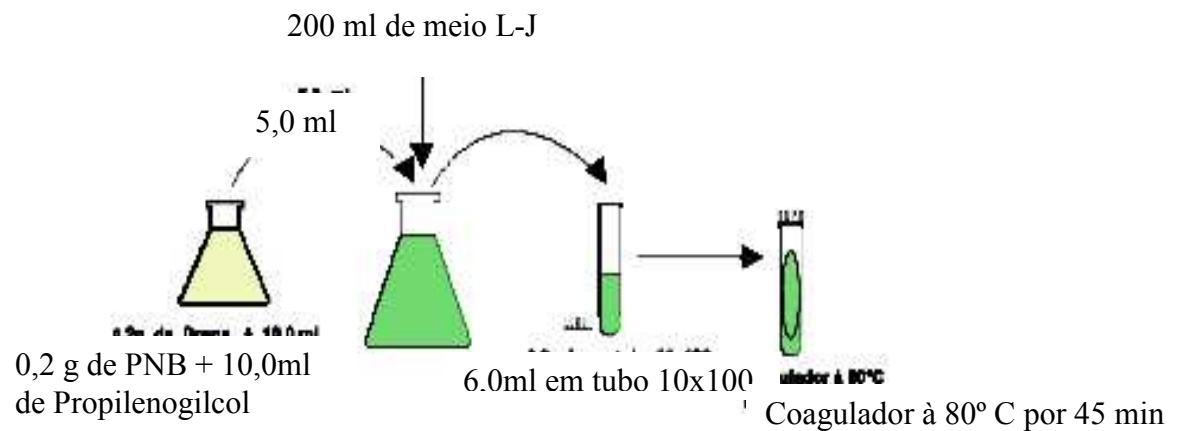
- Agitado o balão suavemente
- Adicionada a solução de verde malaquita a 2 %
- Distribuídos em tubos de vidro com tampa de rosca.
- Coagulado a 80-85 °C por 45 minutos.
- Incubado a 37 °C por 24 horas, para avaliar a esterilidade.
- Estocado em geladeira. (BRASIL, 1994, 2005)

ANEXO C. 3 - MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN COM PNB

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

ANEXO C. 4 - FLUXOGRAMA DO PREPARO DE LOWENSTEIN JENSEN COM PNB

PNB



(BRASIL, 2005).

ANEXO D – MEIO (S) DE CULTURA NA METODOLOGIA DO TSMP

ANEXO D.1 - MEIO DE TSMP

As drogas foram adicionadas ao meio de Lowenstein-Jensen, antes da coagulação. Foram empregadas concentrações das drogas capazes de inibir o desenvolvimento das células sensíveis “concentração críticas”, já definidas na literatura. Levando em conta suas respectivas proporções críticas de mutantes resistentes, estão representadas pelas tabelas a seguir.

Tabela D. 1 - Concentração crítica das drogas empregadas no teste de sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* e proporção crítica de mutantes resistentes

Drogas	Concentrações µ/ml	Proporções (%)
Hidrazida (INH)	0,2	1,0
Rifampicina (RMP)	40,0	1,0
Estreptomicina (SM)	4,0	10.0
Etambutol (EMB)	2,0	1,0

Fonte: BRASIL, 1994, 2005.

As drogas foram diluídas e adicionadas ao meio de LJ, conforme descrito na tabela 2:

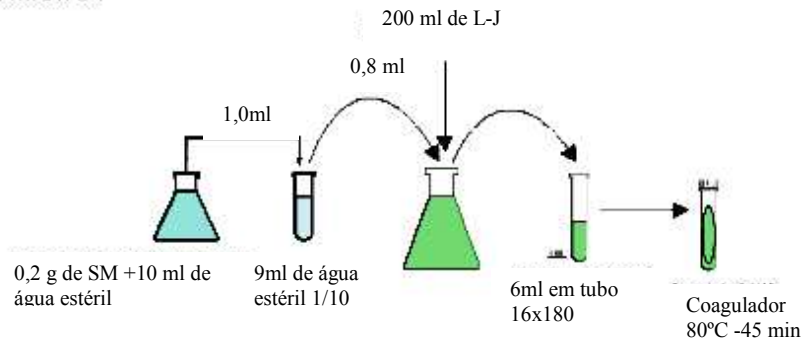
Tabela D. 2- Preparação das soluções e as diluições das drogas que foram incorporadas no meio de Lowenstein-Jensen.

Droga	Potencia (%)	Pesagem(g)	Diluyente (10 ml)	Diluições	Vol. incorporado em 200 ml de LJ
INH	100	0,1	água destilada	1/100	0,4
RMP	100	0,1	etileno glicol	—	0,8
SM	80	0,125	água destilada	1/10	0,8
EM B	100	0,1	água destilada	1/10	0,4

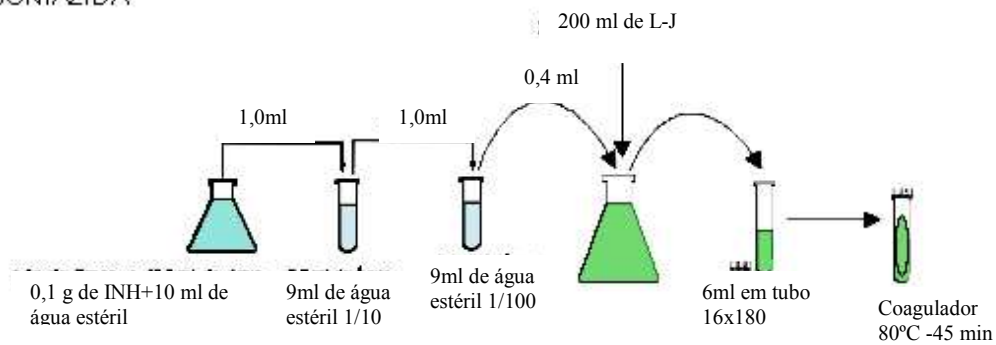
Fonte: BRASIL, 1994, 2005.

ANEXO D. 2 - FLUXOGRAMA DO PREPARO DE MEIO PARA TSMF

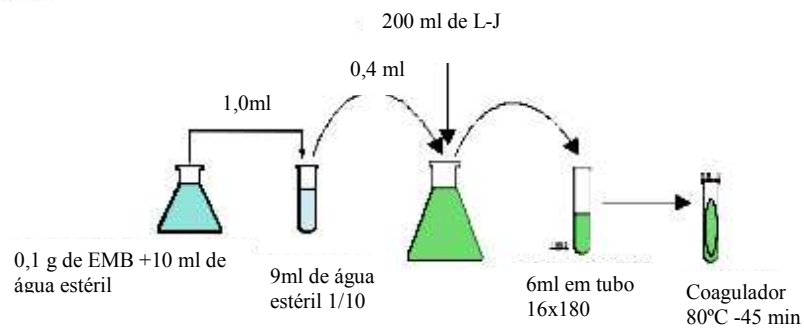
1) ESTREPTOMICINA



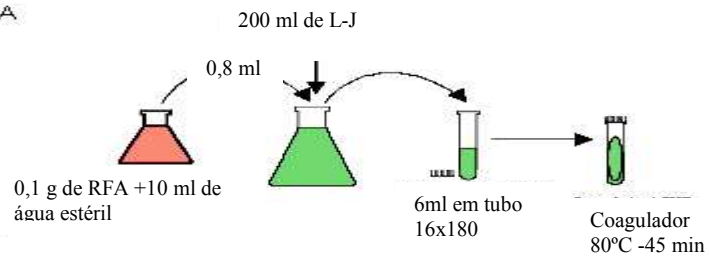
2) ISONIAZIDA



3) ETAMBUTOL



4) RIFAMPICINA



Fonte: BRASIL, 2005.

ANEXO D. 3 - ESCALA DE McFARLAND

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Solução de Cloreto de Bário a 1 %

Foi pesado 1,17 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e dissolvido em água destilada completando o volume final para 100 ml.

Solução de Ácido Sulfúrico a 1%

Foi pipetado 1 ml de H_2SO_4 concentrado e adicionado sobre água destilada completando o volume final para 100 ml.

PREPARO DA ESCALA

Foram numerados seqüencialmente 10 tubos do mesmo tamanho.

Adicionada a solução de cloreto de bário a 1% e solução de ácido sulfúrico a 1 % (V/V) de acordo com a tabela abaixo.

Os tubos foram fechados e mantidos sobre refrigeração.

Quando o precipitado branco de sulfato de bário foi bem agitado, cada tubo ficou com uma densidade diferente que correspondia aproximadamente às suspensões bacterianas referidas na tabela abaixo.

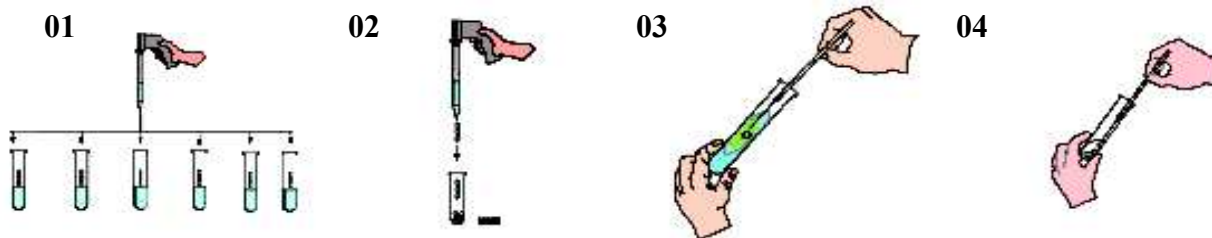
Relação entre o grau de turvação indicado pela escala de McFarland e a concentração bacteriana.

Tabela D. 1 - Relação entre o grau de turvação indicado pela escala de McFarland e a concentração bacteriana.

TUBO	BaCl_2 a 1%	H_2SO_4 a 1%	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (em milhões/ml)
1	0,1	9,9	300
2	0,2	9,8	600
3	0,3	9,7	900
4	0,4	9,6	1. 200
5	0,5	9,5	1. 500
6	0,6	9,4	1. 800
7	0,7	9,3	2. 100
8	0,8	9,2	2. 400
9	0,9	9,1	2. 700
10	1,0	9,0	3. 000

Fonte: BRASIL, 2005.

ANEXO D. 4 - PREPARO DO INÓCULO E SEMEADURA DO TSMP



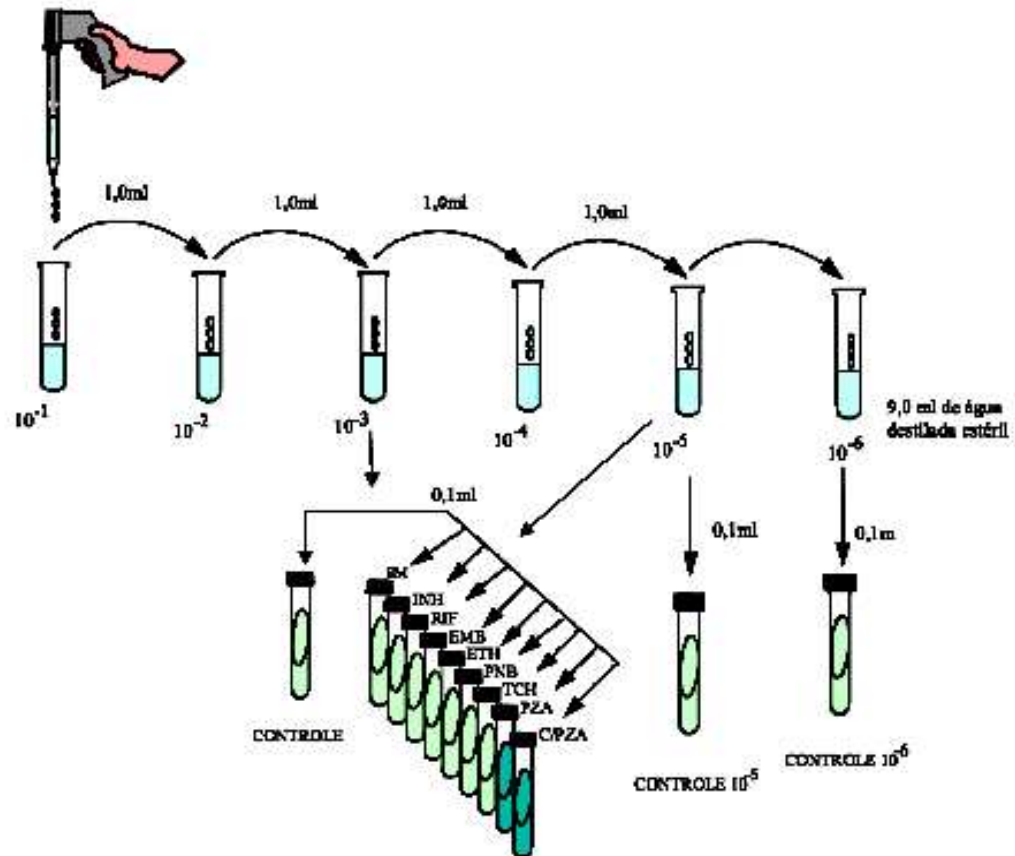
1. Distribuir 9ml de água destilada estéril em cada tubo (com Tampa)
2. Em um tubo de tampa, com perolas de vidro colocar 0,5ml de água destilada estéril.
3. Utilizando uma alça descartável raspar o maior número de colônias possível
4. Transferir para o tubo com perolas de vidro



1. Fechar bem a tampa do tubo com perolas e colônias em suspensão. Agitar em vórtex e depois deixar em repouso por 5 minutos
2. Gotejar a suspensão em um tubo contendo 3ml de água destilada estéril.
3. Este procedimento é até obter uma turvação correspondente ao tubo nº 01 da escala de Mac Farland.

Efetuar diluições sucessivas até o tubo 10^6 e semear segundo esquema abaixo:

7) Efetuar diluições sucessivas até 10^{-6} e semear 0,1 ml nos tubos.



Fonte: BRASIL, 2005.

ANEXO E – COLORAÇÃO DE ZIEHL NEELSEN

ANEXO E. 1 - SOLUÇÃO DE FUCSINA FENICADA A 0,3 %

Fucsina básica	3 g
Álcool etílico a 95% PA	100 ml

Foi dissolvido por agitação a fucsina no álcool e acrescentado 55 ml de fenol líquido e água destilada quente até completar 1.000 ml. Deixado em repouso por 24 horas.

Filtrado com o auxílio de papel de filtro e estocado em frasco escuro identificado.

ANEXO E. 2 - SOLUÇÃO DE FENOL AQUOSO

Fenol cristalizado	1000 g
Água destilada	100 ml

Em um balão volumétrico, foi dissolvido 1.000 g de fenol cristalizado em 100 ml de água destilada. Aquecido em banho-maria. Deixado esfriar.

ANEXO E. 3 - SOLUÇÃO DE AZUL DE METILENO A 0,1%

Azul de metileno	0,1 g
Álcool a 95° (comercial)	100 ml

Foi dissolvido por agitação e adicionado água destilada quente até completar um litro. Permaneceu em repouso por 24 horas, filtrado e estocado em frasco escuro.

ANEXO E. 4 - SOLUÇÃO DESCORANTE

Ácido clorídrico PA	30 ml
Álcool a 95 ° (comercial)	970 ml

Em um frasco foi colocado 970 ml de álcool etílico em seguida com uma pipeta foi gotejado pela parede do frasco 30 ml de ácido clorídrico PA. Agitado “suavemente.”

Observação: Todas as vezes que as soluções corantes foram transferidas para os frascos conta-gotas, foram filtradas. Este procedimento visava evitar a formação de pequenos cristais. (BRASIL, 1994,2005).

ANEXO E. 5 - TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN

A lâmina foi coberta com solução de fucsina fenicada a 0,3 %.

Aquecida até emissão de vapores, por três vezes durante um período de 5 minutos.

Lavada em água corrente.

A lâmina foi coberta com uma solução de álcool-ácido clorídrico (30 ml de ácido clorídrico

PA em 970 ml de álcool etílico a 95 %), por um período de 2 minutos.

Lavada em água corrente.

A lâmina foi coberta com uma solução de azul de metileno a 0,1% por 30 segundos.

Lavada em água corrente e secada naturalmente.

À leitura foi realizada com objetiva de imersão.

(BRASIL, 1994, 2005).

OBSERVAÇÃO: Os resultados da cultura em meio líquido, foram confirmados por esta técnica. Utilizando sedimento da cultura, corado para detecção de BAAR, o fator corda é observado pela formação de agrupamento serpentiniforme dos bacilos (BECTON-DICKSON, 1998).

ANEXO F - PNB - SAT

ANEXO F. 1 - SOLUÇÃO ESTOQUE PARA PNB no SAT

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

1. Foi dissolvido 2,5 g de PNB em 15 ml de solução de 1 N de NaOH.
2. Completado com água destilada estéril até 80 ml.
3. Foi acrescentado 1 ou 2 gotas de fenolftaleína a 0,1 % (solução em etanol).
4. Acrescentado gota a gota (cerca de 3 ml) solução de HCL 1 N até mudança de cor.
5. Nas ocorrências de precipitação, devido ao excesso de ácido, era acrescentado mais um pouco de NaOH e completado com água destilada estéril até 100 ml
6. Aliquotas da solução estoque de PNB foram armazenadas em crio tubos, na quantidade necessária para cada lote de meio.

ANEXO F. 2 - PREPARO DE TUBOS CONTROLE E COM PNB-SAT

Preparo tubos controles sem droga e com PNB

1. Adicionou-se 0,8 ml de OADC em cada tubo MGIT (2 tubos para cada teste e para a cepa controle)

2. Utilizou-se um tubo controle para cada cepa da amostra clinica e para a cepa controle HV37rv.

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

Sendo: Concentração da solução estoque, PNB: 25 µg/ml e concentração final MGI PNB: 0,5 µg/ml (GIAMPAGLIA, 2007).

ANEXO G - TSMA

ANEXO G. 1 - FÓRMULA APROXIMADA POR FRASCO LIOFILIZADO DAS DROGAS PARA TSMA

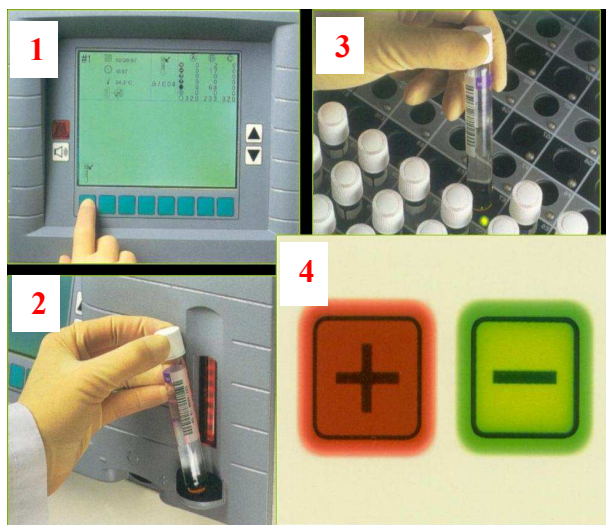
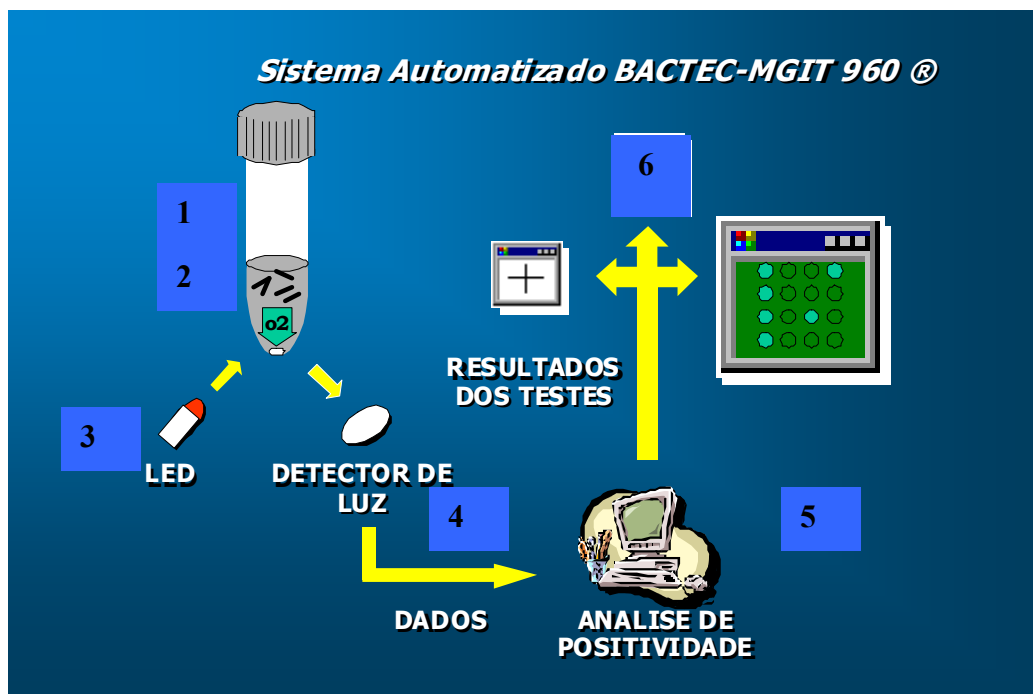
Estreptomicina	332 µg
Isoniazida	33,2 µg
Rifampicina	332 µg
Etambutol	1660 µg
O suplemento foi enriquecido com 20 mL de Middlebrook OADC. TS	
Fórmula para 1 litro de água purificada	
Albumina bovina	50,0 g
Dextrose	20,0 g
Catalase	0,03 g
Ácido oléico	0,6 g

Os frascos liofilizados foram conservados entre 2 e 8 °C. Após a reconstituição, as soluções antibióticas foram congeladas a -20 °C. Após o descongelamento eram usadas imediatamente.

O Suplemento, após a reconstituição foi conservado sob refrigeração entre 2 e 8 °C, ao abrigo da luz (BECTON DICKINSON, 2005).

ANEXO H - ILUSTRAÇÕES

ANEXO H. 1 - ETAPAS DO SISTEMA AUTOMATIZADO BACTEC®MGIT™ 960



1. Tela de Cristal Líquido
2. Leitura de código de barras
3. Introdução do tubo na estação indicada
4. Identificação das gavetas – indicação de crescimento bacteriano

Figura 2 – Ilustração da tela e das etapas operacionais do instrumento

ANEXO H. 2 - SISTEMA AUTOMATIZADO (BACTEC® MGIT™ 960)

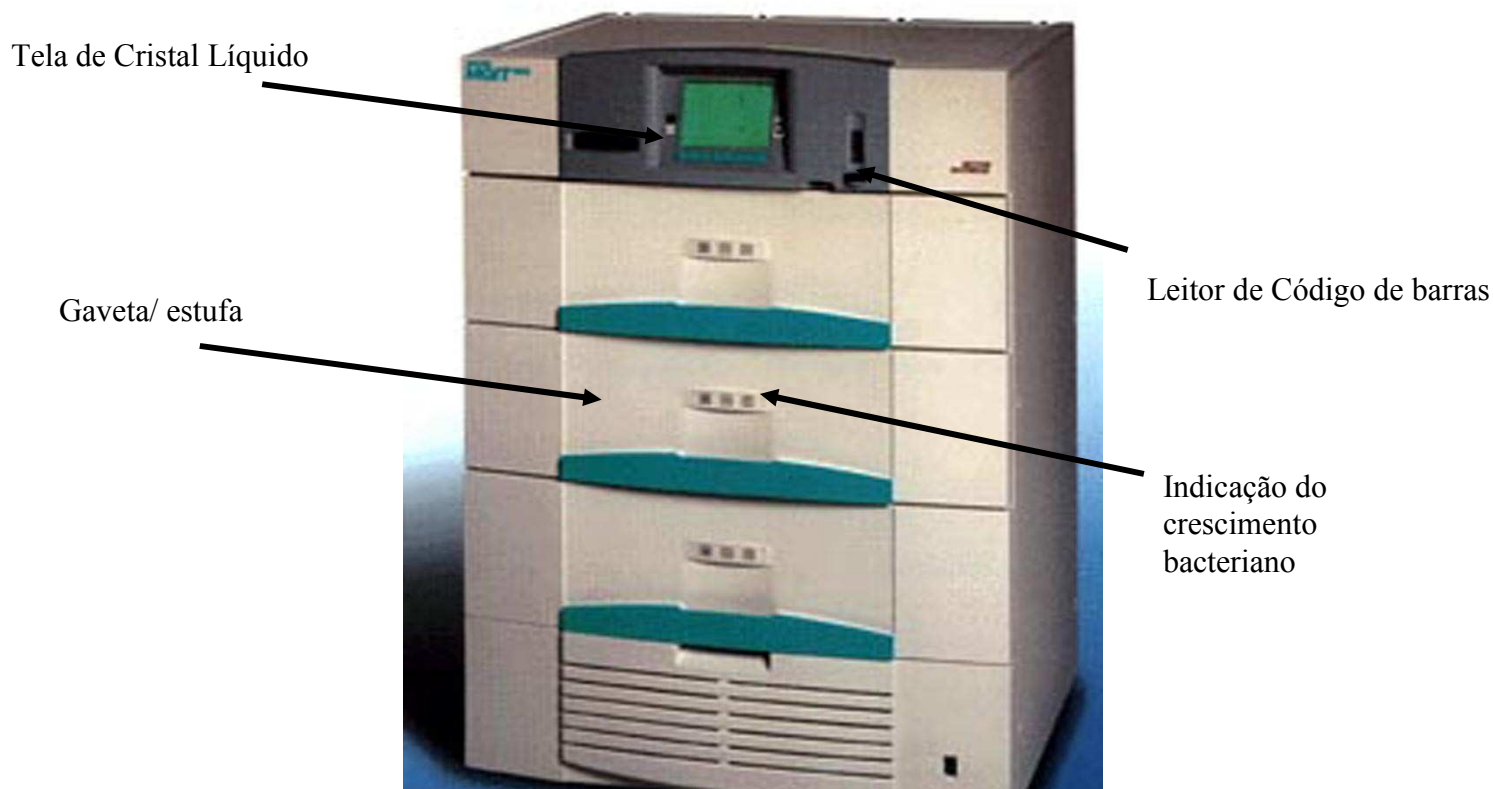


Figura 3- Instrumento BACTEC® MGIT™ 960.

ANEXO H. 3 - TUBOS DE MIDDLEBROOK 7H9 E DOS SUPLEMENTOS PANDA E OADC



Figura 4- Insumos do Sistema BACTEC® MGIT™ 960.

ANEXO H. 4 - FORMAÇÃO SERPENTIFORME DE FATOR CORDA EM MIDDLEBROOK 7H9

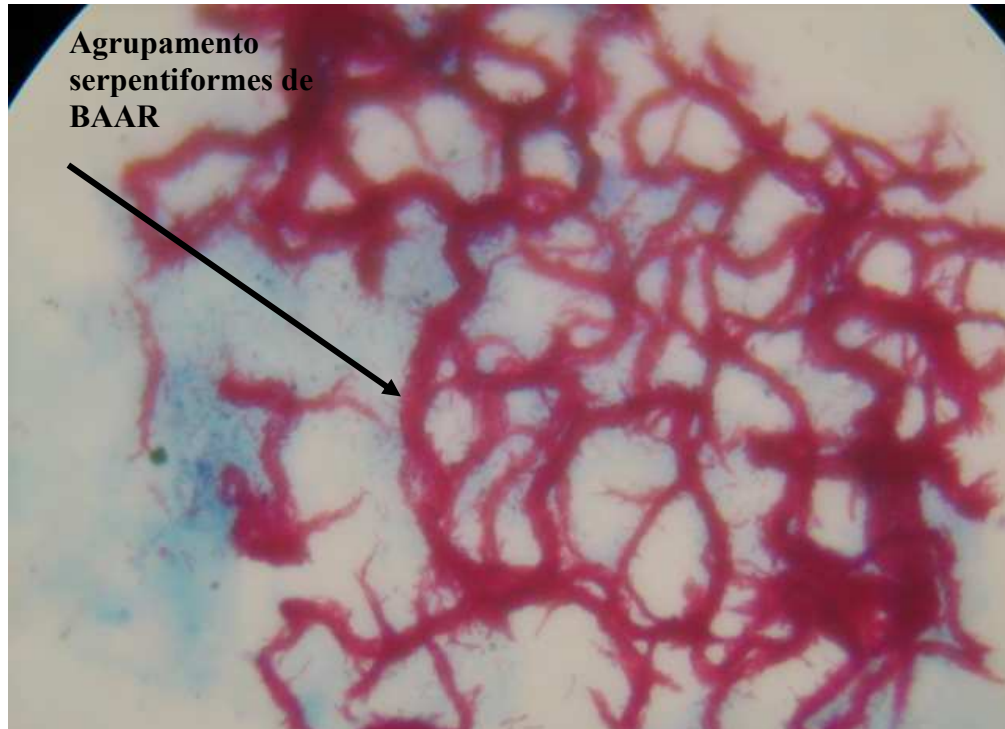
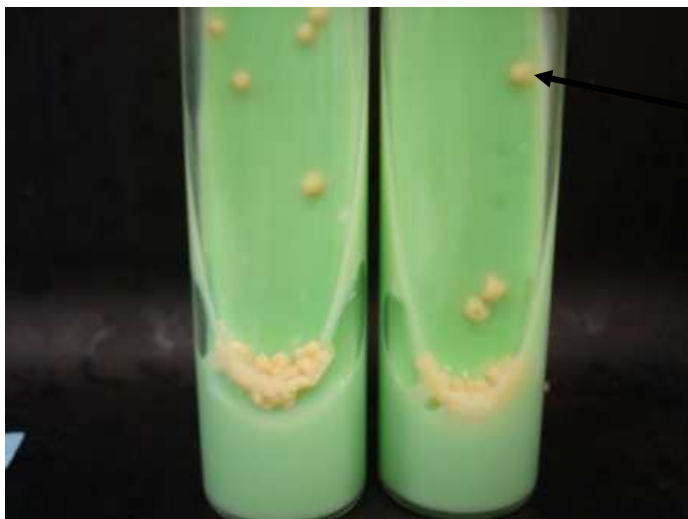


Figura 5: Microscopia ótica em objetiva de imersão, aumento de 1000X, coloração de Ziehl-Neelsen. Presença de BAAR evidenciando formações serpentinales (fator Corda).

ANEXO H. 5 - *Mycobacterium tuberculosis* EM MEIO DE LOWENSTEIN JENSEN



www.ann-clinmicrob.com/.../figure/F5?highres=y

Figura 6-Colônias de *Mycobacterium tuberculosis* em meio de Lowenstein Jensen

ANEXO H. 6 - TESTE DE SENSIBILIDADE MÉTODO AUTOMATIZADO



Figura 7 - Insumos para o Teste de sensibilidade no Sistema BACTEC® MGIT™ 960.

1. Reagentes do Bactec MGIT 960 SIRE KIT:
Frascos com antibióticos liofilizados SM, INH, RMP e EMB



Figura 8 - Conjunto AST

2. Conjunto AST:
Estante, tubo controle e drogas já dissolvidas.



Figura 9- Conjunto AST sendo escaneado

3. Leitura da identificação óptica do código de barras da estante.



Figura 10- Conjunto AST sendo colocada para incubação

4. Incubação do teste de sensibilidade no equipamento.