



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ADRIANA CARVALHO DE ALBUQUERQUE

**COMPARATIVE EVALUATION OF METHODOLOGY AUTOMATED BACTEC
MGIT 960 AND MANUAL WITH SOLID CULTURE MEDIA LOWENSTEIN-
JENSEN FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS IN CLINICAL SAMPLES**

FORTALEZA

2013

ADRIANA CARVALHO DE ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA METODOLOGIA AUTOMATIZADA BACTEC
MGIT 960 E A MANUAL COM O MEIO DE CULTURA SÓLIDO LOWENSTEIN-
JENSEN PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM AMOSTRAS CLÍNICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Nádia Accioly Pinto
Nogueira

FORTALEZA

2013

ADRIANA CARVALHO DE ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA METODOLOGIA AUTOMATIZADA BACTEC
MGIT 960 E A MANUAL COM O MEIO DE CULTURA SÓLIDO LOWENSTEIN-
JENSEN PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM AMOSTRAS CLÍNICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciência Farmacêuticas da
Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem da Universidade Federal do Ceará,
como parte dos requisitos necessários à obtenção
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Banca examinadora:

Prof^ª. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Orientadora)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (UFC)

Dra. Terezinha Feitosa Machado
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

Prof^ª. Dra. Flávia Almeida Santos
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Prof.^a Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira**, não só pela orientação acadêmica, mas também pessoal, pelo apoio incondicional, pela amizade, pelas longas conversas e, por acima de tudo, sempre ter confiado em mim.

Ao professor **Djanilson Barbosa dos Santos**, por todo o apoio, mesmo a distância, e por ter sempre acreditado e confiado na minha capacidade.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia Aplicada, **Andréa Bessa, Rafael Mendes, Gleilton Weyne, Anne Caroline e Fabrício César**, por todo o apoio e paciência. Um agradecimento especial para a amiga **Andressa Helen**, por toda a ajuda, desde o início, mesmo nos conhecendo há tão pouco tempo. Meu mais sincero “obrigado” para a grande amiga **Larissa Queiroz**, que, sem ela, não teria nem iniciado o mestrado. Muito obrigada a todos.

Aos amigos que encontrei no Mestrado, **Alano Martins e Nathalia Beserra**, que compartilharam todas as aflições que este importante passo pode proporcionar.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), especialmente ao **Dr. Ricardo Carvalho**, pela autorização na realização dos meus experimentos, a **Dra. Iracema Patrício**, pelo apoio, a **Dra. Sheila Ferreira, Lindalva e Cely Vitor**, pela ajuda na realização das análises. Agradecimento especial para a **Dra. Elza Gadelha**, minha segunda mãe, pois, apesar de não ter participado diretamente na pesquisa, sempre acreditou em mim. A **Carol Perdigão**, por todo o apoio e amizade.

Ao Laboratório Clementino Fraga, por me receber de braços abertos enquanto eu concluo mais esta etapa na minha vida, em especial a **Jaysa Duarte**, que emprestou seus ouvidos e sua paciência a todos os meus lamentos nas horas mais difíceis.

À secretária **Raimundinha** pela colaboração e amizade.

Aos meus irmãos, **Ivo** e **Luciana**, pelo incentivo.

Aos meus cunhados, **Carlos Alexandre** e **Quéren**, aos meus primos, **Ana Cláudia** e **Daniel**, as minhas tias **Luzia** e **Elizabeth**, por acreditarem que eu poderia fazer sempre mais.

Aos meus pais, **Antônio** e **Eliane**, por terem sempre dito que não há nada mais importante que a educação e terem me ensinado que estudar nunca é demais.

Ao amor da minha vida, **Rafael**, que além da ajuda me deixando e pegando na faculdade, corrigindo a formatação do meu trabalho, verificando as referências bibliográficas, enfim... por sempre estar ao meu lado nos bons e maus momentos, sempre me apoiou, colaborou e incentivou, passando de namorado a marido durante o mestrado, e trazendo a minha vida muita felicidade. Você é minha vida. Eu te amo.

Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.
Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
E o outro vê uma prova para sua paciência.
Onde você vê a morte,
Alguém vê o fim
E o outro vê o começo de uma nova etapa...
Onde você vê a fortuna,
Alguém vê a riqueza material
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.
Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro compreende as limitações do companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.
E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.
"Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura."

Fernando Pessoa

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que aflige a humanidade desde a antiguidade com relatos de até cerca de 5.000 a.C. Apesar da alta eficiência do tratamento, a TB continua como um grande problema de saúde. Em 2011, estimou-se 8,7 milhões de casos incidentes de TB no mundo todo. Dentre as principais medidas para o controle da tuberculose estão o diagnóstico precoce e o correto tratamento da doença. Desta forma, a busca ativa deve ser realizada permanentemente por todos os serviços de saúde (níveis primário, secundário e terciário). O estudo teve como objetivo geral avaliar os benefícios da metodologia automatizada no diagnóstico da tuberculose em diferentes amostras clínicas em relação à metodologia manual. Trata-se de um estudo descritivo e experimental para avaliação de dois testes diagnósticos (manual e automatizado) pelos quais diversas amostras foram analisadas. A pesquisa foi realizada no período de julho a setembro de 2011. As amostras foram fornecidas por pacientes, de 15 Unidades de Saúde do Estado, que necessitavam de cultura para confirmação ou controle da tuberculose. Em 1.520 amostras, na baciloscopia, 188 (12,37%) amostras apresentaram-se positivas e 1.332 (87,63%) negativas. Nas culturas em meio sólido (LJ), por metodologia manual, 254 (16,71%) amostras foram positivas, 1.156 (76,05%) negativas e 110 (7,24%) apresentaram contaminação. Na metodologia automatizada (MGIT), o resultado foi de 258 (16,97%) positivas, 1.149 (75,59%) negativas e 113 contaminadas (7,43%). A mediana do tempo necessário para positividade no método manual foi de 31,95 dias, com desvio médio de 15,01 e na metodologia automatizada foi de 16,53 dias, com desvio padrão de 12,39. Foi possível demonstrar concordância entre os métodos e diversas vantagens que a metodologia automatizada apresenta em comparação a manual na rotina do laboratório. Dentre elas está a diminuição do tempo de detecção da doença, representando um grande avanço no início do tratamento dos pacientes, o que, no caso da TB, pode significar a diminuição do número de casos, já que pessoas doentes deixariam de ser bacilíferas.

Palavras – chave: Tuberculose. Diagnóstico. Metodologia.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) and an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* that afflicted mankind since antiquity with reports of up to about 5,000 BC. Despite the high efficiency of treatment, TB remains a major health problem. In 2011, an estimated 8.7 million incident cases of TB worldwide. Among the main measures for tuberculosis control are early diagnosis and proper treatment of the disease. Thus, the active search should be performed continuously for all healthcare services (primary, secondary and tertiary). The study aimed to evaluate the benefits of automated methodology for the diagnosis of tuberculosis in different clinical specimens in relation to the methodology manual. This is a descriptive study and experimental evaluation of two diagnostic tests (manual and automated) for which several samples were analyzed. The survey was conducted from July to September 2011. The samples were provided by patients of 15 health units of the State, which needed to confirm or culture tuberculosis control. In the 1520 samples, smear, 188 (12.37%) samples were positive and 1,332 (87.63%) negative. In cultures on solid media (LJ), a manual methodology, 254 (16.71%) samples were positive, 1,156 (76.05%) and 110 negative (7.24%) were contaminated. In automated methodology (MGIT), the result was 258 (16.97%) positive, 1,149 (75.59%) and 113 negative contaminated (7.43%). The median time to positivity in the manual method was 31.95 days, with a mean deviation of 15.01 and automated methodology was 16.53 days, with a standard deviation of 12.39. It was possible to demonstrate concordance between the methods and various advantages that automated methodology presents compared to manual in the laboratory routine. Among them is the decreased time to detection of the disease, representing a breakthrough in the initial treatment of patients, which, in the case of TB, may mean to decrease the number of cases, since people no longer be bacillary patients.

Keywords: Tuberculosis. Diagnosis. Methodology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Robert Koch	22
Figura 2 – Estimativa das taxas de incidência de tuberculose no mundo, 2011.	25
Figura 3 – Estimativa da prevalência do HIV entre novos casos de tuberculose, 2011.	26
Figura 4 – Micrografia eletrônica do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
Figura 5 – Mecanismos envolvidos na ativação de macrófagos e linfócitos T por micobactérias	31
Figura 6 – Imagem de bacilos corados	36
Figura 7 – Colônias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio Löwenstein-Jensen	36
Figura 8 – Meio de Cultura Löwenstein-Jensen	37
Figura 9 – Meio de Cultura do equipamento BACTEC MGIT 960	38
Figura 10 – Meio de Cultura Löwenstein-Jensen	47
Figura 11 – Tubos de meio LJ dispostos na bandeja	48

Figura 12 – Equipamento BACTEC MGIT 960	49
Figura 13 – Lâmina de baciloscopia (aumento de 1000x)	51
Figura 14 – Tubos de meio LJ contaminados	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Tempo necessário para a positivação das amostras distribuídas em percentil 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das amostras de espécimes clínicos analisados (n=1.520), 55 segundo a procedência (capital e interior).

Tabela 2 – Distribuição das amostras de espécimes clínicos analisados, provenientes de 56 Fortaleza (n=726), segundo hospitais e postos de saúde de origem.

Tabela 3 – Distribuição quantitativa das amostras de espécimes clínicos analisados 57 (n=1.520)

Tabela 4 – Distribuição dos resultados obtidos para as amostras de espécimes clínicos 58 analisados (n=1520), por baciloscopia e cultura (metodologia manual e automatizada).

Tabela 5 – Presença de bacilos álcool ácidos resistentes nas amostras de espécimes 60 clínicos analisados.

Tabela 6 – Correlação entre o resultado da baciloscopia e o tempo de posituação das 61 amostras de espécimes clínicos analisados na metodologia automatizada (cultura em meio líquido 7H9)

Tabela 7 – Correlação entre o resultado da baciloscopia e o tempo de posituação das 61 amostras de espécimes clínicos analisados na metodologia manual (cultura em meio sólido LJ)

Tabela 8 – Correlação entre a ocorrência de contaminação nas culturas das amostras de 62 espécimes clínicos pelas metodologias realizadas (manual e automatizada)

Tabela 9 – Correlação entre o material clínico analisado e a ocorrência de contaminantes nas culturas na metodologia manual (LJ) e a metodologia automatizada (MGIT) 64

Tabela 10 – Correlação entre os resultados das culturas na metodologia manual (LJ) e na metodologia automatizada (MGIT) 65

Tabela 11 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e razão de verossimilhança da metodologia automatizada em relação à metodologia manual 65

Tabela 12 - Correlação entre os resultados das culturas na metodologia manual (meio LJ) e na metodologia automatizada (meio *Middlebrook 7H9*), considerando o crescimento de bactérias tuberculosas e não-tuberculosas e a ocorrência de contaminação 66

Tabela 13 – Correlação entre a metodologia automatizada e a baciloscopia 67

Tabela 14 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo das metodologias manual e automatizada em relação à baciloscopia. 67

Tabela 15 – Correlação entre a metodologia manual e a baciloscopia 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BCG	Bacilo <i>Calmette-Guérin</i>
BFC	Broncofibroscopia
BK	Bacilo de Koch
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DOTS	<i>Directly Observed Treatment Strategy</i>
Et	Etambutol
H	Isoniazida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INH	Isoniazida
LBA	Lavado brônquico-alveolar
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LJ	Löwenstein-Jensen
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
NaOH	Hidróxido de Sódio

NK	<i>Natural Killer</i>
NOS	Óxido nítrico sintetase
OK	Ogawa-kudoh
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
PNB	Para-nitrobenzóico
PNCT	Programa Nacional de Controle a Tuberculose
R	Rifampicina
RMP	Rifampicina
RNI	Radicais intermediários do nitrogênio
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose multirresistente
TBXR	Tuberculose extensivamente resistente
TLR	Receptores tipoToll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TS	Teste de Sensibilidade
WHO	<i>World Health Organization</i>
Z	Pirazinamida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Aspectos Históricos da Tuberculose	22
2.2	Aspectos Epidemiológicos	25
2.3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> e a patogênese da doença	28
2.4	Resistência Bacteriana	33
2.5	Diagnóstico	35
2.6	Tratamento	40
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo Geral	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Tipo, período e local de estudo	46
4.2	Critérios de inclusão e exclusão	46
4.3	Aspectos éticos	47
4.4	Metodologia	47
4.4.1	<i>Preparação da Amostra</i>	47
4.4.2	<i>Cultura em meio sólido (LJ) – Método Manual</i>	48
4.4.3	<i>Cultura em meio líquido 7H9 – Método automatizado BACTEC MGIT 960</i>	50
4.4.4	<i>Baciloscopia</i>	51

4.4.5	Análises estatísticas	52
5	RESULTADOS	55
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que aflige a humanidade desde a antiguidade com relatos de cerca de 5.000 a.C.. Uma das primeiras evidências da TB foi observada em 44 múmias que datam de 3.700 a 1.000 a.C., no Egito (DANIEL, 2005). Existem achados que indicam a presença da bactéria na África há três milhões anos e que todos os membros do complexo tiveram um ancestral africano em comum, entre 15.000 – 35.000 anos atrás (GUTIERREZ *et al.*, 2005). No século XVII, a tuberculose, também conhecida como peste branca, matou um número elevado de pessoas na Europa (DUCATI *et al.*, 2006). No ano de 1882, Robert Koch identificou e isolou o agente etiológico *M. tuberculosis*, cujo cultivo e inoculação permitiram reproduzir a doença em outro ser vivo, determinando o diagnóstico da patologia (DANIEL, 2005).

Há indícios que os jesuítas foram os responsáveis pela introdução da tuberculose no Brasil desde a época do descobrimento (DUCATI *et al.*, 2006). No período imperial brasileiro, a mortalidade por TB se aproximava de 1/150 habitantes (CAMPOS; PIANTA, 2001). As condições socioeconômicas atreladas ao baixo desenvolvimento do sistema educacional, fizeram com que a tuberculose se tornasse uma doença de caráter preocupante em todo país (BRASIL, 2009). Por este fato, a despeito de sua origem milenar, a TB nunca deixou de ser um assunto tratado pelas políticas públicas, possuindo uma grande participação nos programas do governo relacionados ao combate e prevenção de doenças.

Mycobacterium tuberculosis apresenta-se como um bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR), com várias características, sendo elas a ausência de flagelos, a não formação de esporos, a aerobiose restrita entre outras (BORGES, 2009). As micobacterioses possuem quadros clínicos semelhantes, por isso a importância do diagnóstico diferencial para a escolha do tratamento correto (BRASIL, 2009). A disseminação da tuberculose (TB) acontece por via aérea, transportada por gotículas de saliva expelidas pela tosse, fala ou espirro dos doentes, apresentado contágio mais frequente pelas vias respiratórias onde o bacilo se aloja nos pulmões (PERESI, 2007). A transmissão é facilitada por aglomerações humanas, ambientes pouco arejados e maior tempo de contato com o doente bacilífero (MELO 2010).

A tuberculose resistente surgiu da mutação dos bacilos e da seleção realizada por meio de tratamentos inadequados ou incompletos. Estas situações são as principais responsáveis pela seleção dos bacilos com maior resistência aos tratamentos, dificultando a

cura dos pacientes e propagando a doença em todo o mundo. Além destes fatores, o surgimento do vírus do HIV apresentou importante papel, visto que esse vírus interfere no sistema imunológico do hospedeiro, dificultando as defesas frente ao bacilo. (DALCOMO; NORONHA; PICON, 2007). Em 2008, a OMS contabilizou a maior taxa de casos TBMR já registrada. Os cinco países com a maior taxa de TBMR são Índia, China, Rússia, África do Sul e Bangladesh (WHO, 2008).

Dentre as principais medidas para o controle da tuberculose estão o diagnóstico precoce e o correto tratamento da doença. A baciloscopia, pelo método de Ziehl Neelsen, é de extrema importância por detectar os casos bacilíferos, ou seja, casos infecciosos de tuberculose pulmonar, responsáveis pela transmissão (BRASIL, 2005). A cultura é uma metodologia sensível e específica para o diagnóstico da TB, seja pulmonar e/ou extrapulmonar, sendo utilizados meios à base de ovo, meio a base de ágar e os meios líquidos. Os meios líquidos são mais enriquecidos que os sólidos e por isso são indicados para amostras paucibacilares, como sangue, LCR e macerados de tecidos (BRASIL, 2008).

Devido aos avanços tecnológicos, vários métodos automatizados para a detecção de micobactérias surgiram. O Sistema MGIT, um dos métodos automatizados desenvolvidos, permite a detecção do consumo de oxigênio das micobactérias, em tubos de ensaio contendo meio líquido *Middlebrook 7H9* e o rutênio, metal que funciona como um sensor químico fluorescente (BRASIL, 2008).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Históricos da Tuberculose

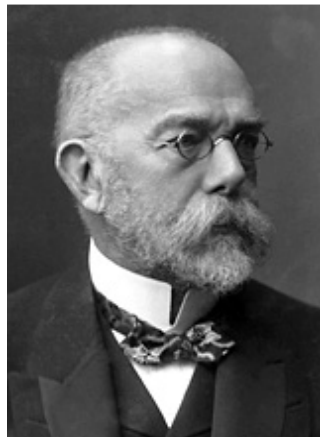
A tuberculose (TB) é uma doença de origem milenar cujo principal agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis*, que leva milhares de pessoas a óbito a várias gerações (DANIEL, 2005). O gênero *Mycobacterium* tem uma genealogia muito antiga, sendo que modernas técnicas de genética molecular e sequenciamento de genoma de várias linhagens procuram fazer uma estimativa fidedigna da sua origem (DANIEL, 2006). Este fato é possível de ser observado, considerando o nível de conservação dos genes de *M. tuberculosis*, a pobreza de mutações e dados de análise de deleção do genoma (MATHEMA *et al.*, 2006). Estudos indicam que a bactéria esteve presente na África há três milhões anos e que todos os membros do complexo tiveram um ancestral africano em comum, entre 15.000 – 35.000 anos atrás (GUTIERREZ *et al.*, 2005).

Apesar de ter sido descrita pela primeira vez na Índia, a tuberculose pulmonar é relatada desde o tempo de Hipócrates como tísico, que em grego significa definhar (DUCATI *et al.*, 2006). Os egípcios, compreendendo a progressão da doença, isolavam os seus pacientes, enquanto que na Roma Antiga, eram descritos os hábitos dos doentes e uma possível cura por meio de repouso e climas melhores (BURNIE, 2005). Nos séculos XIV e XV, os médicos começaram a demonstrar a possibilidade de contágio entre pessoas, entretanto, soube-se muito pouco da doença até o século XVI. A tuberculose, também conhecida como peste branca, matou um número elevado de pessoas na Europa na segunda metade do século XVII (DUCATI *et al.*, 2006). Em 1750, na Europa Ocidental, a tuberculose chegou a apresentar taxas de 200 a 400 óbitos por 100.000 pessoas por ano (DANIEL, 2006).

A partir dos séculos XVII e XVIII, a tuberculose passa a ser mais bem compreendida e recebe seu nome atual (ROBERTS; BUIKSTRA, 2005). Como a doença tornou-se completamente estabelecida entre todos os níveis sociais europeus, atingindo muitos intelectuais e artistas no final do século XIX, a tuberculose foi romantizada, sendo que os sintomas típicos como face magra e pálida passaram a serem vistos como sinônimos de beleza (DANIEL, 2006). A referida doença foi a principal causa de morte até o final do século XIX e início do século XX (DUCATI *et al.*, 2006).

No processo de descobrimento do bacilo, o médico Gerolamo Fracastoro (1478-1553) percebeu que a doença era transmitida por via aérea por meio de um provável agente vivo eliminado pelos doentes, e também recomendava o isolamento sanatorial como forma de controle da doença. Apenas em 1865, Jean Antoine Villemin (1827-1892) demonstrou, experimentalmente, a transmissão aérea da tuberculose através do desenvolvimento da enfermidade em cobaias expostas aos indivíduos doentes (BURNIE, 2005). A história da tuberculose mudou drasticamente em 1882, quando Robert Koch (Figura 1) apresentou o bacilo que ele havia identificado e isolou seu agente etiológico, cujo cultivo e inoculação permitiram reproduzir a doença em outro ser vivo, determinando o diagnóstico etiológico da patologia (DANIEL, 2005).

Figura 1 - Robert Koch



Fonte: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1905/koch-bio.html

A melhoria da qualidade de vida em alguns países, no século XX, e a iniciação do tratamento com antibióticos na década de 1940 foram determinantes para a queda na mortalidade pela doença, concomitantemente a políticas de saúde pública para o controle da tuberculose (CARVALHO, 2011). O tratamento específico alterou mundialmente, de forma bastante radical, o perfil epidemiológico da doença, com uma queda acentuada nos coeficientes de mortalidade. Com a comprovação da eficácia dos quimioterápicos na cura da tuberculose, evidenciada ao longo das décadas de 1950 e 1960, o tratamento passou a ser primordialmente ambulatorial, apresentando, como consequência, a desativação dos sanatórios e uma grande proporção dos hospitais destinados à tuberculose (FERNANDES, T; ALMEIDA; NASCIMENTO, 2007).

A tuberculose era considerada praticamente uma doença em via de extinção nos países desenvolvidos, entretanto, no ano de 1985 os índices voltaram a crescer, sendo apontada como a principal responsável pelas mudanças de direção das curvas de prevalência a pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Este fato fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1995, declarasse a tuberculose como uma emergência sanitária mundial (SILVA; BOÉCHAT, 2004). Foram evidenciadas altas taxas de cura nas décadas de 1970 e 1980, devido ao uso da isoniazida e da rifampicina, favorecendo uma falsa impressão de controle da doença. Entretanto, o aumento da resistência bacteriana fez ressurgir o interesse da comunidade acadêmica pela necessidade de desenvolver novos esquemas terapêuticos (KRITSKI *et al.*, 2007).

No Brasil, acredita-se que a tuberculose foi introduzida por missionários jesuítas e portugueses desde 1500 (DUCATI *et al.*, 2006). No período imperial brasileiro, a mortalidade por TB se aproximava de 1/150 habitantes (CAMPOS; PIANTA, 2001). Da mesma maneira que ocorreu na Europa durante a Revolução Industrial, a epidemia de TB no Brasil tornou-se realidade na maior parte das cidades, sendo denominada “a praga dos pobres”, dada sua estreita relação com moradias insalubres, com falta de higiene e com alimentação deficiente, elementos observados na população mais acometida (SHEPPARD, 2001). Durante este período, mantinham-se elevadas taxas de morbidade e mortalidade pela doença, o que continuaria até meados do século XX, época na qual, efetivamente, as mesmas começariam a declinar, com o advento da terapia farmacológica (ANTUNES; WALDMAN; MORAES, 2000).

Um evento importante para a história da TB no século XX foi a Reforma Carlos Chagas, a qual dá início, em 1920, a uma fase de maior comprometimento do Estado no controle da TB. A vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin), iniciada em 1927, fez parte da difusão de avanços científicos da época. A Inspetoria de Profilaxia da Tuberculose (1920), o Serviço Nacional de Tuberculose (1940), e a Campanha Nacional Contra a Tuberculose (1946) coordenaram políticas nacionais, como o uso da quimioterapia no cuidado da doença no Brasil (HIJJAR *et al.*, 2007).

O Plano Emergencial para o Controle da Tuberculose, criado em 1996, teve como principal objetivo aumentar a cobertura do Programa de Controle da Tuberculose em 230 municípios considerados de alta carga da enfermidade, municípios esses que registravam 75% dos casos estimados para o Brasil. Em 1999, foi lançado o Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), cuja finalidade foi de ampliar as ações em todo o território nacional,

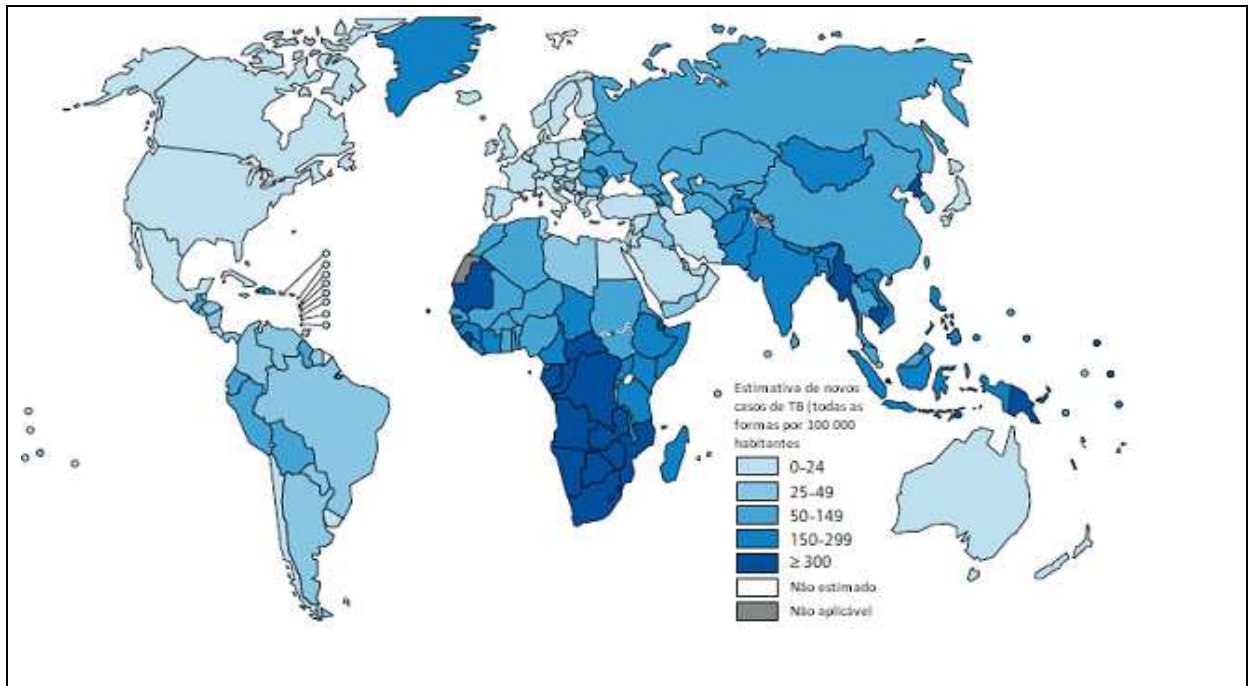
tendo, um ano depois, a formalização, pelo Ministério da Saúde, da implantação da estratégia do Tratamento Supervisionado (TS) e da estratégia DOTS (*Directly Observed Treatment Strategy*) (BRASIL, 2011a). O PNCT tem dentre suas metas manter a detecção anual de pelo menos 70% dos casos estimados de TB, tratar corretamente 100% dos casos de tuberculose diagnosticados e curar pelo menos 85% dos mesmos, manter o abandono de tratamento em percentuais considerados aceitáveis (5%), manter registro atualizado dos casos diagnosticados e 100% do resultado de tratamento e disponibilizar teste anti-HIV para 100% dos adultos com TB (BRASIL, 2009).

Em 2001, as ações do PNCT tornaram-se competência da atenção básica. A expansão das ações de controle para 100% dos municípios foi definida nesse nível de atenção e estratégias como dose supervisionada, redução do abandono e diagnóstico precoce, estabelecidas para implantação em todo território nacional. Em 2006, a TB foi incluída como uma estratégia do Plano Nacional de Atenção Básica com indicadores para serem monitorados e avaliados (SCATENA *et al.*, 2009).

2.2 Aspectos Epidemiológicos

Apesar da alta eficiência do tratamento, a tuberculose (TB) continua como um grande problema de saúde. Em 2011, estimou-se 8,7 milhões de casos incidentes de TB no mundo todo, o equivalente a 125 casos por 100.000 habitantes. Grande parte dos casos ocorreu na Ásia (59%) e África (26%), uma menor proporção de casos ocorreu na região do Mediterrâneo Oriental (7,7%), na Região Europeia (4,3%) e na Região das Americas (3%) (Figura 2). Dos 8,7 milhões de casos incidentes, aproximadamente 0,5 milhões eram em crianças e 2,9 milhões ocorreram entre as mulheres. Os países com o maior número de casos incidentes em 2011 foram a Índia (2,0 - 2,5 milhões), China (0,9 - 1,1 milhões), África do Sul (0,4 - 0,6 milhões), Indonésia (0,4 - 0,5 milhões) e Paquistão (0,3 - 0,5 milhões). Índia e China, sozinhas, responderam por 26% e 12% dos casos mundiais, respectivamente (WHO, 2012).

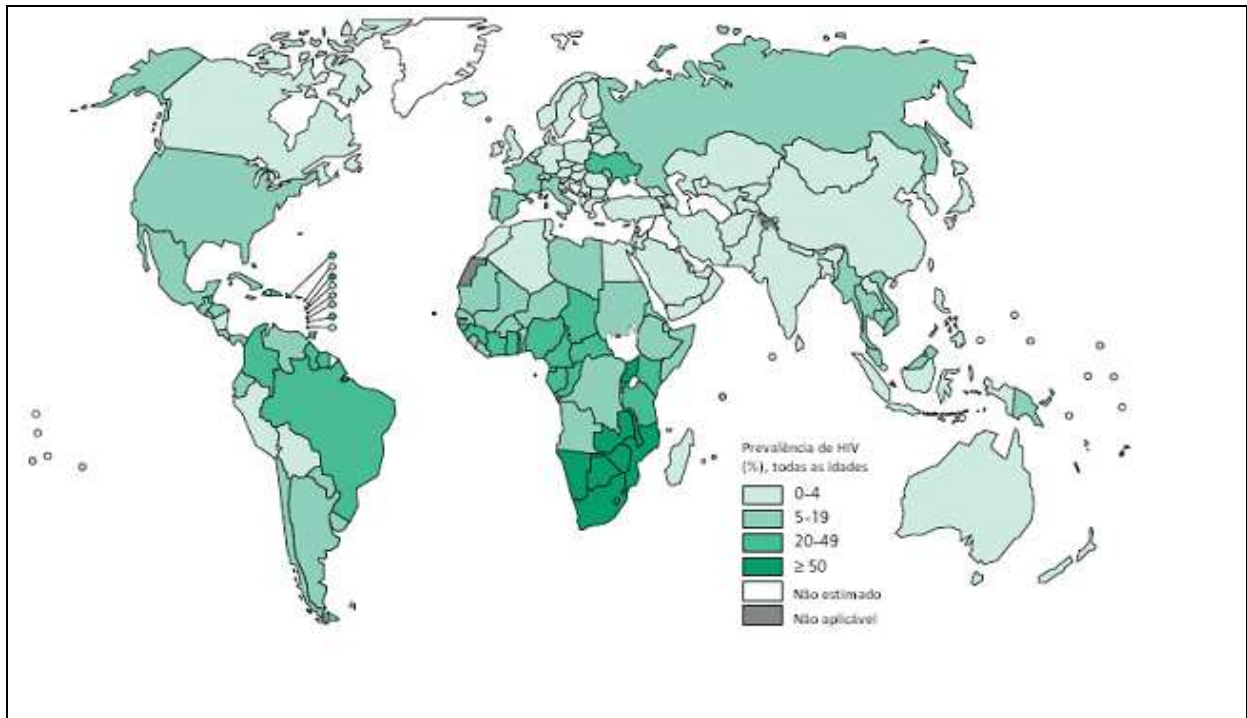
Figura 2 - Estimativa das taxas de incidência de tuberculose no mundo, 2011.



Fonte: WHO, 2012

Dos 8,7 milhões de casos incidentes em 2011, 1,0 - 1,2 milhão (12-14%) estavam entre as pessoas HIV-positivo. A maior proporção de casos de co-infectados com HIV foi nos países da Região Africano (Figura 3). De maneira geral, 39% dos casos de tuberculose identificados na África eram de indivíduos co-infectados com HIV, o que representa 79% dos casos de tuberculose entre pessoas que vivem com HIV em todo o mundo. Mundialmente, as taxas de incidência foram relativamente estáveis de 1990 até por volta de 2001, e depois começou a baixar. Entre 2010 e 2011, a taxa de declínio foi de 2,2% (WHO, 2012).

Figura 3 - Estimativa da prevalência do HIV entre novos casos de tuberculose, 2011.



Fonte: WHO, 2012

O progresso econômico e social juntamente com a descoberta de drogas eficientes conduziu a tuberculose a baixos níveis nos países desenvolvidos na década de 1980, diminuindo a expressividade da doença em âmbito internacional (DYE; WILLIAMS, 2010). O número absoluto de casos incidentes está caindo, embora lentamente, como a queda na taxa de incidência (por 100.000 habitantes) superior à taxa de crescimento da população do mundo. A taxa de declínio entre 2010 e 2011 foi de 0,5% na Região Oriental do Mediterrâneo, 2,0% na região do Sudoeste da Ásia, 2,3% na Região Oeste do Pacífico, 3,1% na Região Africana, 3,8% na região das Américas e 8,5% ao ano na Região Europeia (WHO, 2012).

O desenvolvimento social do Brasil, apresentando pobreza, fraquezas da organização do sistema de saúde e deficiências de gestão, reflete o problema da tuberculose no país. Neste contexto, o panorama nacional apresentado é de 130.000 casos novos e o registro de 6.000 óbitos em 2009, configurando uma situação mais grave do que a apresentada por outros países latino-americanos como Argentina, Chile, Colômbia, Venezuela, Cuba e México (BRASIL, 2009). O Brasil ocupa a 19ª posição, já tendo ocupado o 14º lugar em 2004 no *ranking* dos países com maior incidência no mundo, apresentando-se como um dos 22

países responsáveis por 80% da carga mundial de TB. As taxas de incidência e de mortalidade também veem diminuindo, passando de 51,7 por 100.000 habitantes em 1990 para 38,3 em 2009, com uma queda de 26%. A taxa de mortalidade caiu 30%, de 3,6 para 2,5 por 100.000 habitantes no mesmo período (BRASIL, 2010).

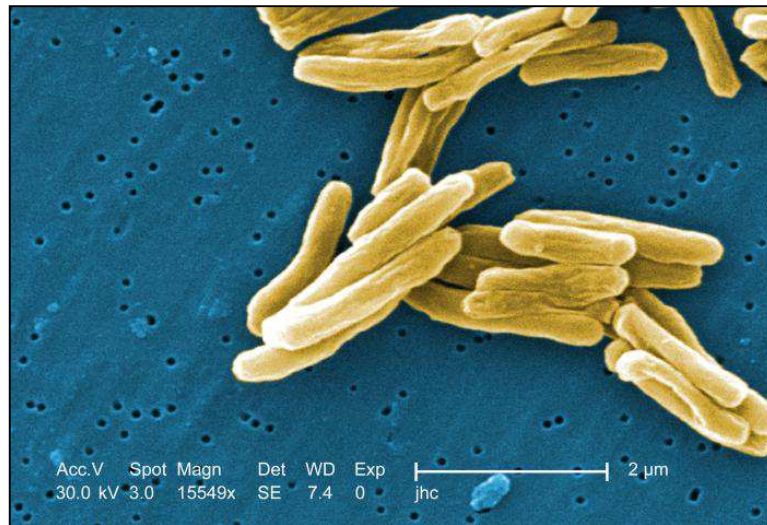
No estado do Ceará, foram notificados 3.430 casos novos em 2010, tendo uma taxa de incidência de 40,1 por 100.000 habitantes apresentando-se superior a média nacional (37,8/100.000 habitantes). A série histórica, entre os anos de 2001 e 2010, apresenta uma pequena tendência de declínio nas taxas de incidência, passando de 46,8 para 40,1 por 100.000 habitantes em todas as formas clínicas (BRASIL, 2011b).

2.3 *Mycobacterium tuberculosis* e a patogênese da doença

Mycobacterium tuberculosis é um bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR), sem flagelos, não formador de esporos, aeróbio restrito, não produtor de toxinas e intracelular facultativo, possuindo um longo período de geração (16-20 horas) que varia de acordo com o oxigênio, nutrientes e pH do meio. O diagnóstico microbiológico é dificultado pelo fato do bacilo ser uma forma de crescimento lento, estando este fato associado à natureza crônica da infecção e a duração longa do tratamento (BORGES, 2009). Também conhecido como bacilo de Koch (BK), o *M. tuberculosis* faz parte de um complexo onde se apresentam também *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. Quadros clínicos semelhantes à tuberculose podem ser produzidos por outras micobactérias, sendo este o principal motivo da necessidade do diagnóstico diferencial (BRASIL, 2009).

Aproximadamente 250 genes do *M. tuberculosis* (Figura 4) estão envolvidos na síntese metabólica de compostos da parede celular, apresentando-se formada de ácido graxo de cadeias longas (ácidos micólicos) e ainda glicolípídeos, entre outros componentes. Uma vez associados à peptidoglicanos, os ácidos graxos formam uma parede periférica hidrofóbica que ainda contribui para aspectos de patogenicidade do *M. tuberculosis*, como a inibição de interferon- γ (IFN- γ) (BANAIEE *et al.*, 2006) ou a alteração do estado de latência (KEEP *et al.*, 2006).

Figura 4 - Micrografia eletrônica do *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>

A disseminação da tuberculose acontece por via aérea, transportada por gotículas de saliva expelidas pela tosse, fala ou espirro dos doentes, apresentado contágio mais frequente pelas vias respiratórias onde o bacilo se aloja nos pulmões (PERESI, 2007). A transmissão é facilitada por aglomerações humanas, ambientes pouco arejados e maior tempo de contato com o doente bacilífero (MELO, 2010).

Afetando mais comumente os pulmões, a tuberculose também pode atingir outros órgãos do corpo como os ossos, rins e meninges. Ela é transmitida pelo ar, como uma gripe comum, e a forma pulmonar é responsável pela cadeia de transmissão. Cada pessoa com tuberculose não tratada pode infectar de 10 a 15 pessoas por ano. Contudo, a maioria dos indivíduos é capaz de combater a infecção, desenvolvendo-se a doença somente em uma pessoa a cada dez (WHO, 2010).

Existem alguns fatores relacionados com a transmissão do *M. Tuberculosis*, dentre eles, o número de microrganismos expelidos, a concentração dos microrganismos no ar, intervalo de tempo que a pessoa exposta respira o ar contaminado e o estado imunológico do indivíduo exposto. O diagnóstico precoce e o início do adequado tratamento são de extrema importância para o controle da tuberculose, reduzindo, desta maneira, as fontes de infecção e o risco de transmissão (BENTO *et al.*, 2011).

A tuberculose pode manifestar-se sob diversas apresentações clínicas. Os sintomas da enfermidade estão relacionados com o local do corpo onde os bacilos da

tuberculose estão se desenvolvendo. A tuberculose pulmonar se apresenta com tosse persistente, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento. Outros sinais podem ocorrer e devem ser valorizados na investigação diagnóstica individualizada, considerando a diferente apresentação da tuberculose extrapulmonar (BRASIL, 2009). A forma miliar, vinculada ao aspecto radiológico pulmonar, é uma forma grave de doença e ocorre em 1% dos casos de TB em pacientes HIV soronegativos, e em até 10% dos casos em pacientes HIV soropositivos, em fase avançada de imunossupressão (BRASIL, 2011a).

As apresentações extrapulmonares da TB têm seus sinais e sintomas dependentes dos órgãos e/ou sistemas acometidos. Dentre os exemplos estão a tuberculose pleural, que é a mais comum forma de TB extrapulmonar em indivíduos HIV soronegativos, a tuberculose ganglionar periférica, que é a forma mais frequente de TB extrapulmonar em pacientes HIV soropositivos e crianças, sendo mais comum abaixo dos 40 anos, e a meningoencefálica responsável por 3% dos casos de TB em pacientes HIV soronegativos e por até 10% dos casos em pacientes HIV soropositivos (BRASIL, 2011a).

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento da tuberculose. Dentre eles, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2010) faz referência a indivíduos infectados com HIV, abuso de drogas, silicose, diabetes, doença renal grave, baixo peso corporal, transplantados, cânceres de cabeça e pescoço, tratamento medicamentosos com o uso de corticosteroides, tratamento para artrite reumatoide e doença de Crohn. A OMS acrescenta à lista, indivíduos desabrigados, em prisões (em estado de confinamento), tabagismo, alcoolismo e em certas ocupações, como trabalhadores de hospitais, sendo que o tabagismo e o HIV/AIDS estão no topo da lista dos fatores de risco (WHO, 2005).

Uma média de 4 a 12 semanas é necessária para a detecção das lesões primárias. A evolução da infecção até o desenvolvimento da doença depende de diversos fatores como a idade avançada, as condições socioeconômicas e algumas condições médicas (*diabetes mellitus*, alcoolismo, silicose, uso prolongado de corticosteroides ou outros imunossupressores, neoplasias, uso de drogas, infecção pelo vírus HIV). O quadro clínico está relacionado com características como se o indivíduo está sendo infectado pela primeira vez, o que depende da virulência do bacilo, da fonte infectante e das características genéticas do indivíduo, onde a resposta imunológica está relacionada (BRASIL, 2009). A intensidade e probabilidade da transmissão dependem da duração e da intensidade da exposição, fatores

relacionados ao hospedeiro, e características de virulência do *M. tuberculosis* (KANG *et al.*, 2005).

As manifestações da doença dependem do balanço entre a virulência do microrganismo e a competência imunológica do hospedeiro, combinação entre a resposta inata e a adquirida, uma vez que a proteção da resposta inata é limitada e o bacilo pode se multiplicar dentro do macrófago e disseminar-se hematologicamente (MARAIS *et al.*, 2005). A infecção inicial ocorre nos pulmões, desenvolvendo a doença, geralmente, nos três primeiros anos após início. Outros modos de transmissão menos comuns são via cutânea, congênita ou por transplante de algum órgão, entretanto a forma pulmonar é a mais frequente, apresentando-se em 80% das formas clínicas (BORGES, 2009).

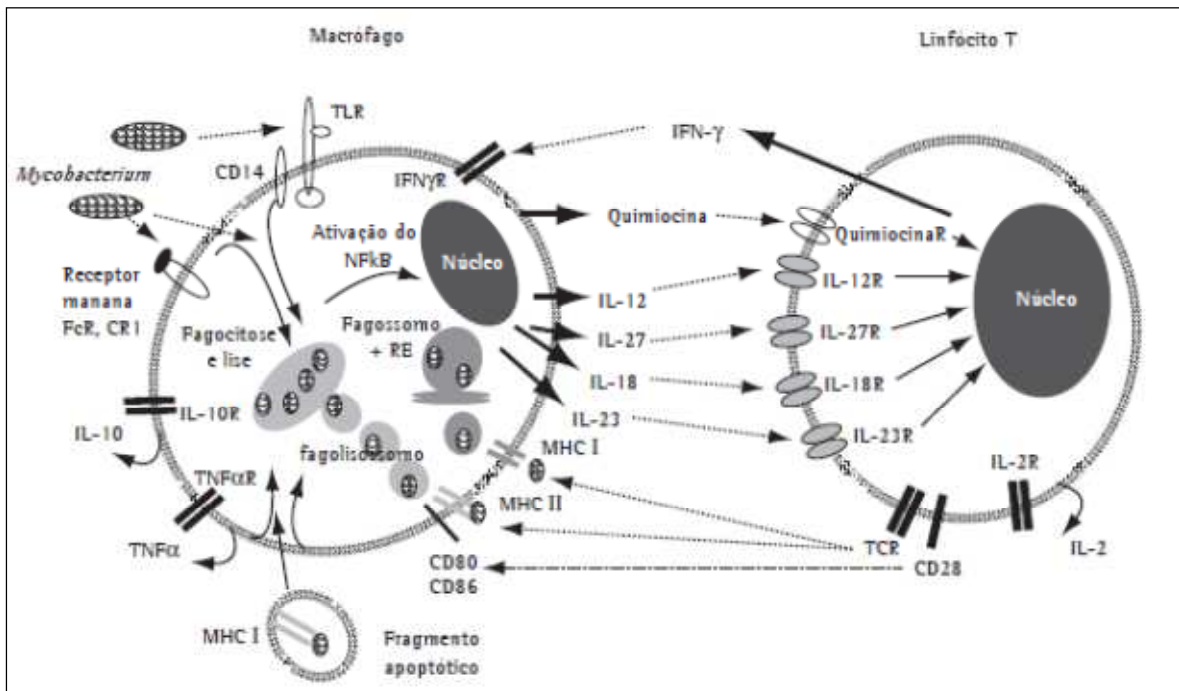
A resposta imune anti-micobactérias envolve principalmente linfócitos T ativados por macrófagos e suas funções microbicidas por meio da liberação de interferon- γ (IFN- γ). Este processo faz com que haja a produção de granulomas, onde são encontrados macrófagos e células dendríticas, cruciais para a contenção da micobactérias. As células dendríticas têm a habilidade única de ativar linfócitos após a sua migração para sítios infecciosos, capturam antígenos e os levam para os linfonodos, onde eles expressarão grandes quantidades de moléculas de apresentação (NICOD, 2007).

Após uma infecção primária, os macrófagos alveolares e células dendríticas migram através do sistema linfático em direção ao linfonodo regional, e formam o complexo de Ghon. Ao mesmo tempo, as células fagocíticas podem penetrar no parênquima pulmonar, iniciando um foco inflamatório para onde outros macrófagos serão atraídos, o que, nesse caso, forma o acúmulo de células inflamatórias ao redor do microrganismo, iniciando a formação de um granuloma. O bacilo é contido no granuloma, podendo persistir por décadas nas lesões, em uma forma latente, sem desencadear a doença. A imunodepressão é a causa mais frequente da multiplicação de bacilos enclausurados no granuloma e reativação da TB (reativação endógena), comparada à reinfecção (exógena) pelo *M. tuberculosis* (KAUFMANN, 2005).

Após a fagocitose, os bacilos são apresentados aos linfócitos T CD4+ pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II, MHC-II, presente nos macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Essas células são chamadas de apresentadoras de antígenos (APCs) e produzem citocinas inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e a interleucina-1 (IL-1), capazes de recrutar neutrófilos e monócitos (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Células CD4+ do tipo 1 (Th1) desempenham a função principal na resposta imune à micobactéria. Com relação à resposta imune inata, os neutrófilos são as primeiras células

inflamatórias a localizar-se no sítio de multiplicação do bacilo, seguidas das células destruidoras naturais, células *natural killer* (NK), e macrófagos. As células NK podem destruir os patógenos diretamente, ou os monócitos infectados, e ativar células fagocíticas no sítio da infecção (Figura 5) (NORTH; JUNG, 2004).

Figura 5 - Mecanismos envolvidos na ativação de macrófagos e linfócitos T por micobactérias.



Fonte: Teixeira *et al.*, 2007.

Os receptores tipoToll (TLRs) são os principais envolvidos no reconhecimento de antígenos e responsáveis pela ativação de macrófagos e células dendríticas. As citocinas produzidas pelas APCs, como a IL-12, e citocinas produzidas pelos linfócitos T ativados, como a IL-2, mantêm a ativação e a proliferação de linfócitos, o que induz a resposta celular predominantemente pró-inflamatória. O IFN- γ é a principal molécula ativadora de macrófagos, a citocina-chave para o controle da infecção, mas insuficiente. Com o TNF- α , estimula a produção de óxido nítrico sintetase (NOS-2), responsável por altos níveis de óxido nítrico e outros radicais intermediários do nitrogênio (RNI), que são bactericidas e participam da resistência à infecção pelo *M. tuberculosis*. A IL-12 aumenta a produção de IFN- γ em células *natural killer* (NK) e a expansão de células Th1 antígeno específicas. Outras citocinas

como a interleucina-23 (IL-23), interleucina-18 (IL-18) e interleucina-27 (IL-27) também são importantes indutoras da produção de IFN- γ (TEIXEIRA *et al.*, 2007). A figura 5 mostra a esquematização do processo imunológico.

Após a infecção, antígenos da micobactéria são secretados em vesículas apoptóticas, associados ao MHC classe I, e estimulam células T CD8⁺ através do fenômeno denominado apresentação cruzada e, uma vez ativadas, essas linfócitos também produzem IFN- γ e liberam grânulos enzimáticos ricos em granzima, que ativam outras enzimas capazes de degradar lipídios e causar a lise celular por apoptose (GROTZKE; LEWINSON, 2005).

2.4 Resistência Bacteriana

A tuberculose por bacilos resistentes a rifampicina (RMP) e à isoniazida (INH) foi, em 1980, nomeada como *multi drug resistant tuberculosis* (TBMR) nos Estados Unidos, sendo que as formas resistentes aumentaram significativamente entre os anos de 1982 e 1986. No Brasil, a tuberculose multirresistente (TBMR) recebe as denominações de confirmada ou provável. Na confirmada, o diagnóstico é realizado por identificação e teste de sensibilidade com resistência a rifampicina, isoniazida e mais um fármaco. Na provável, apresenta a falência ao esquema de tratamento e sensibilidade a rifampicina ou isoniazida (DALCOMO; NORONH; PICON, 2007). Em 2008, a OMS contabilizou a maior taxa de casos TBMR já registrada. Os cinco países com a maior taxa de TBMR são Índia, China, Rússia, África do Sul e Bangladesh (WHO, 2008).

A virulência dos bacilos responsáveis pela transmissão da tuberculose resistente é menor que a sensível, apesar de ambas apresentarem a mesma forma de transmissão. (Instituto Clemente Freire, 2011). Este fato foi comprovado em estudos onde bacilos resistentes produziam menor número de lesões e mortes, pesquisas em que contatos de focos resistentes adoeciam menos do que os contatos de focos drogas sensíveis (SOOLINGEN *et al.*, 1999) e estudos onde bacilos resistentes a isoniazida apresentavam uma mutação no gene KatG, que são fundamentais para a vida dos bacilos, tornando-os menos virulentos (BARNES; CAVE, 2003).

Existem diversos mecanismos pelos quais uma bactéria pode adquirir resistência, entretanto, o *M. tuberculosis* só apresenta resistência por meio de mutação, e as mutações

espontâneas no cromossoma ocorrem numa taxa de 1×10^8 células por geração (JAIN; DIXIT 2008). Uma grande quantidade de fatores é responsável pelo surgimento do *M. tuberculosis* resistente, sendo alguns deles uma implementação ineficaz de programas de controle, escassez de recursos, ineficiência no fornecimento dos medicamentos, instabilidade política e falta de comprometimento dos governantes (VALIM, 2006). A TBMR, no mundo, ganhou ênfase na década de 1980 após um surto em Nova Iorque, quando grandes esforços foram feitos para o controle da doença naquele país (Instituto Clemente Freire, 2011). Para a isoniazida o gene que confere a resistência é o gene *katG* e para resistência à rifampicina, o gene *rpoB* (MITCHISON, 2005).

O teste de suscetibilidade (TS) é o exame laboratorial realizado para identificar o perfil de resistência/sensibilidade das cepas microbianas, entretanto, existe uma controvérsia sobre a utilização dos TS no manejo do tratamento individual de pacientes. Nos países onde existem recursos financeiros, é recomendada a realização do TS para todos os pacientes no momento do diagnóstico. Nos países com escassez de recursos financeiros os TS são indicados apenas em ocasiões especiais (BRASIL, 2008).

A resistência do *M. tuberculosis* pode ser classificada como natural, que surge no processo de multiplicação do bacilo naturalmente, primária, que se verifica em pacientes nunca tratados para tuberculose contaminados por bacilos previamente resistentes, e adquirida ou secundária, sendo aquela inicialmente sensível, se torna resistente após a exposição aos medicamentos. A resistência adquirida é decorrente de esquemas inadequados, uso irregular do esquema terapêutico por má adesão ou falta temporária de medicamentos principalmente (BRASIL, 2011a). 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 iriam se multiplicar (BRASIL, 2005).

Entre os anos de 2000 e 2004, a OMS e o CDC avaliaram 14.706 amostras de escarro provenientes de 49 países e, no grupo de pacientes com TBMR resistentes a isoniazida e rifampicina, algumas amostras apresentaram resistência a outras drogas, surgindo então a Tuberculose Extensivamente Resistente (TBXR). A TBXR é a forma causada por bactérias resistentes a rifampicina e isoniazida acrescida à resistência a uma fluoroquinolona e a um injetável de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina). Existem registros de

pelo menos um caso de tuberculose TBXR até 2010 em 58 países, incluindo o Brasil (WHO, 2010).

O I (primeiro) Inquérito de Resistência aos Medicamentos anti-tuberculose, realizado em 1996, revelou proporções de 8,5%, para casos novos, e 21%, para casos com tratamento prévio, de resistência. Na multirresistência, as proporções foram de 1,1%, casos novos, e 7,9%, casos prévios. A maioria dos casos de multirresistência no mundo é adquirida por tratamentos irregulares e abandono. No Brasil, 96% dos casos de resistência notificados são adquiridos, sendo que mais da metade tem um histórico de três ou mais tratamentos prévios para tuberculose, com lesões cavitárias bilaterais em 65% dos casos, e coinfeção pelo HIV de 7% (BRASIL, 2011a).

2.5 Diagnóstico

Dentre as principais medidas para o controle da tuberculose estão o diagnóstico precoce e o correto tratamento da doença. Desta forma, a busca ativa deve ser realizada permanentemente por todos os serviços de saúde (níveis primário, secundário e terciário). A descoberta de casos bacilíferos é de extrema importância para a interrupção da cadeia de transmissão. É importante ressaltar que cerca de 90% dos casos de TB são da forma pulmonar e, destes, 60% são bacilíferos, isto é, aqueles cuja baciloscopia de escarro é positiva e, estes são a principal fonte de disseminação e infecção da doença (MARGON, 2011).

Para a conclusão positiva do diagnóstico da tuberculose, o indivíduo deve apresentar um dos seguintes quadros: duas baciloscopias diretas positivas; uma baciloscopia direta positiva e cultura positiva; uma baciloscopia direta positiva e imagem radiológica sugestiva de tuberculose (BRASIL, 2009).

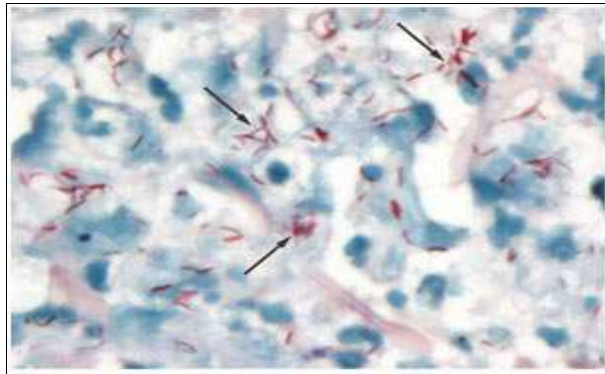
Para o diagnóstico da doença é estabelecido que pacientes com suspeita de TB pulmonar devem ter pelo menos duas amostras de escarro coletadas para exame micobacteriológico. O indivíduo sintomático respiratório, ou seja, indivíduo com tosse e/ou dispneia e/ou dor torácica, acompanhado ou não de expectoração e/ou hemoptise e/ou sibilância, radiografia de tórax sugestiva de TB deve ter cultura com teste de sensibilidade solicitada em pelo menos uma amostra de escarro (além da pesquisa de BAAR) sempre que possível. Para pacientes com suspeita de TB na radiografia de tórax e sem expectoração espontânea devem ser submetidos à indução de escarro (CONDE *et al.*, 2009).

Os primeiros exames a serem solicitados para pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar são a radiografia de tórax e a pesquisa de BAAR no escarro, que tem elevado valor preditivo positivo (> 95%), mas baixa sensibilidade (40-60%) (CONDE *et al.*, 2009). Todo paciente com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, deve ter a radiologia solicitada, pois diferentes achados radiológicos apontam para suspeita de doença em atividade ou no passado, além do tipo e extensão do comprometimento pulmonar. Além disso, ele apresenta fundamental importância na exclusão de doença pulmonar associada que necessite de tratamento concomitante e permite o acompanhamento da evolução radiológica durante a terapêutica, especialmente naqueles sem resposta satisfatória (BRASIL, 2011a).

A baciloscopia, pelo método de Ziehl Neelsen, um método de simples execução, continua sendo particularmente importante no combate da tuberculose por ser de baixo custo e por detectar casos bacilíferos, ou seja, casos infecciosos de tuberculose pulmonar, responsáveis pela transmissão. É o método prioritário para o diagnóstico e acompanhamento dos casos de TB pulmonar. Trata-se da pesquisa microscópica de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) em amostras clínicas como o escarro. Apesar de ser uma técnica rápida, com baixo custo, e de fácil realização, capaz de diagnosticar de 25% a 65% dos pacientes, apresentando baixa sensibilidade quando comparada a cultura (BRASIL, 2005).

A baciloscopia de escarro (Figura 6) deve ser realizada em, no mínimo, duas amostras, sendo uma, durante a primeira consulta, e outra, independentemente do resultado da primeira, na manhã do dia seguinte, preferencialmente ao despertar. Nos casos em que há indícios clínicos e radiológicos de suspeita de TB e as duas amostras de diagnóstico apresentem resultado negativo, podem ser solicitadas amostras adicionais. A baciloscopia de controle é indicada para acompanhar a eficácia do tratamento através da redução bacilar e/ou negativação do escarro em exames mensais, independentemente do volume da secreção. O número mínimo de BAAR necessário para produzir um esfregaço com resultado positivo tem sido estimado entre 5.000 a 10.000 por mililitro (BRASIL, 2011a).

Figura 6 - Imagem de bacilos corados



Fonte: http://www.nature.com/nrneph/journal/v3/n12/fig_tab

A cultura é uma metodologia sensível e específica para o diagnóstico da TB, seja pulmonar e/ou extrapulmonar, permitindo a multiplicação e o isolamento do agente etiológico, a partir de semeadura da amostra clínica em meios de cultura específicos para micobactérias (Figura 7). Estes meios apresentam-se como meio à base de ovo, meio a base de ágar e os meios líquidos. Os meios líquidos são mais enriquecidos que os sólidos e por isso são indicados para amostras paucibacilares, como sangue, LCR e macerados de tecidos (BRASIL, 2008). A cultura permite a identificação do *M. tuberculosis* e a realização do teste de sensibilidade, além de aumentar o rendimento diagnóstico em 20-40% (CONDE *et al.*, 2009).

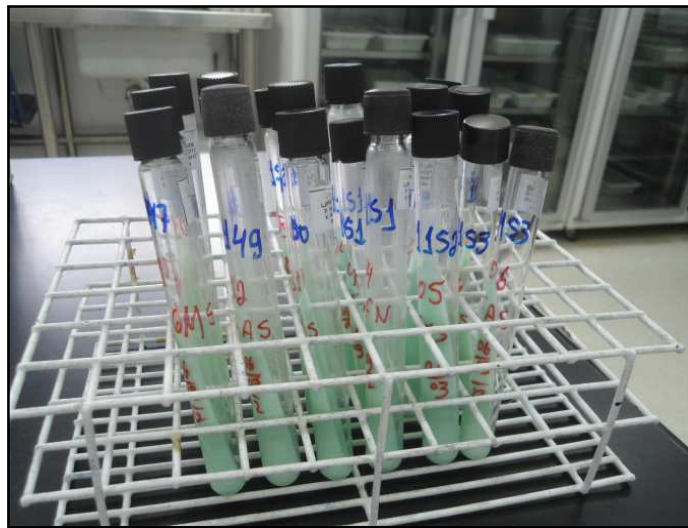
Figura 7 - Colônias de *Mycobacterium tuberculosis* em meio Lowenstein-Jensen



Fonte: <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/tuberculosis.html>.

No meio sólido a base de ovo, o meio é solidificado a base de ovo (após ser submetido à temperatura de 80°C), que é um fornecedor de fonte proteica, sendo ideal para o crescimento micobacteriano e identificação de cepas, por provas bioquímicas (BRASIL 2005). Os meios de cultura à base de ovo mais utilizados, Löwenstein-Jensen (LJ) (Figura 8) e Ogawa-Kudoh (OK), são preparados em tubos ou frascos e podem ficar por até 8 semanas em refrigeração. Todos contêm o corante verde de malaquita 2%, para inibir a microbiota contaminante. Esses meios permitem a incorporação de substâncias como ácido p-nitrobenzóico (PNB) a 500 µg/ml (LJ-PNB) que pode ser utilizado na semeadura primária da amostra para agilizar uma identificação prévia da espécie de micobactéria, considerando que microrganismos que crescem nos meios LJ e PNB são classificadas como micobactérias não-tuberculosas (MNT) (BRASIL, 2008).

Figura 8 - Meio de cultura Löwenstein-Jensen



Fonte: Arquivo pessoal.

Os meios a base de ágar (extrato de algas capaz de solidificar o meio) são economicamente mais caros, de difícil preparo e exigem o uso de antibacterianos para evitar a contaminação por outros agentes microbianos que não as micobactérias, estando disponíveis, por exemplo, o *Middlebrook* 7H10 e o 7H11 (LIMA *et al.*, 2005). Estes meios apresentam-se com aspecto transparente, permitindo a visualização precoce das colônias por lupas ou microscópio. Os meios líquidos, como o Herman Kirchner, 7H9 e 7H12 de *Middlebrook*, são mais enriquecidos que os sólidos e por isso indicado para isolamento de amostras

paucibacilares, como sangue, LCR e macerados de tecidos. Apesar de apresentarem um maior percentual de contaminação, são incluídos no esquema de isolamento primário das micobactérias e também utilizados para subcultivos e armazenamento de cepas em freezer (BRASIL, 2008).

Com o avanço tecnológico, vários métodos automatizados surgiram como o BACTEC 460 System, o *Middlebrook 7H9* e o BACTEC 960 – MGIT (Figura 9). O método automatizado BACTEC 460, baseado no sistema de detecção radiométrico, utiliza o meio líquido *Middlebrook 7H12* acrescido de ácido palmítico marcado com o radioisótopo carbono 14 (^{14}C), oferecendo uma resposta em aproximadamente 7 a 10 dias. Contudo, aparentemente promissor, o BACTEC 460TB apresentava desvantagens. Entre estas, são relatados resultados falso-positivos entre 1,4% e 4%, devido à contaminação por outras espécies de microrganismos durante a leitura pelo equipamento, além de um sério problema quanto ao descarte de material radioativo (CONDE *et al.*, 2009). O Sistema MGIT permite a detecção do consumo de oxigênio das micobactérias, em tubos de ensaio contendo meio líquido *Middlebrook 7H9* e o rutênio, metal que funciona como um sensor químico fluorescente (BRASIL, 2008).

Figura 9 - Meio de cultura do equipamento BACTEC MGIT 960.



Fonte: Arquivo pessoal.

Como método auxiliar do diagnóstico, pode ser referida a prova tuberculínica cutânea (PPD) para pessoas não vacinadas com BCG, entretanto o resultado positivo

evidencia apenas a infecção por micobactérias, não caracterizando a presença de doença. A leitura é realizada de 72 a 96 horas após a aplicação, medindo-se com régua milimetrada o maior diâmetro transversal da área de endurecimento palpável. O resultado, registrado em milímetros, define a classificação e interpretação clínica como não reator, reator fraco ou reator forte. No não reator, o indivíduo não se apresenta infectado pelo *M. tuberculosis* ou por outra micobactéria ou infectado pelo bacilo há menos de duas semanas ou, ainda e excepcionalmente, em infectados ou doentes imunodeprimidos. O reator fraco apresenta-se como um indivíduo vacinado com BCG ou infectado pelo *M. tuberculosis* ou por outras micobactérias. No caso do reator forte, o indivíduo infectado pelo *M. tuberculosis* pode estar doente ou não, ou recentemente vacinado com BCG (BRASIL, 2009).

O exame anátomo-patológico deve ser realizado, sempre que possível nas formas extrapulmonares. Embora esta forma seja paucibacilar, o diagnóstico bacteriológico (assim como o diagnóstico histopatológico) deve ser buscado. Todo material coletado por biópsia deve ser também armazenado em água destilada ou soro fisiológico (ambos estéreis) para viabilizar a realização da cultura (CONDE *et al.*, 2009). As análises sorológicas e os métodos moleculares são úteis para o diagnóstico precoce da tuberculose. A amplificação de ácidos nucleicos para o diagnóstico da tuberculose pode fornecer um resultado dentro de 2 a 48 h e apresenta maior valor preditivo positivo do que a baciloscopia. Além deste fato, os testes moleculares podem auxiliar a identificação do complexo diferenciado das micobactérias tuberculosas das não tuberculosas. Apesar disto, a sensibilidade, especificidade e valores preditivos variáveis, aliados ao alto custo e complexidade, os inviabilizam como exames de rotina, ficando seu uso restrito a alguns centros de pesquisa (BRASIL, 2011a).

2.6 Tratamento

A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo adequado são os princípios básicos para o tratamento contra a tuberculose, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, apenas desta maneira a cura pode ser atingida. Juntamente a estes princípios está o Tratamento Diretamente Observado (*Directly Observed Treatment Strategy* - DOTS) como estratégia essencial para o sucesso do tratamento. Uma vez iniciado o tratamento, ele não deve ser interrompido, salvo

após uma rigorosa revisão clínica e laboratorial que determine mudanças de diagnóstico (LOPES, 2006).

O DOTS foi proposto, em 1993, pela OMS para o combate a doença. A estratégia é composta por cinco elementos: compromisso dos governos ao suporte financeiro; capacidade de diagnóstico bacteriológico; suprimento regular de todos os medicamentos essenciais; sistema padronizado de registro e notificação; tratamento de seis a oito meses supervisionado pelo menos nos dois meses iniciais (SCATENA *et al.*, 2008).

A transmissibilidade está presente desde os primeiros sintomas respiratórios, regredindo rapidamente após o início de tratamento efetivo. Por muitos anos considerou-se que, após 15 dias de tratamento o paciente já não transmitia a doença. Entretanto, na prática clínica, quando o paciente não tem história de tratamento anterior nem outros riscos conhecidos de resistência, esta afirmação é verdadeira. Contudo, com base em evidências, recomenda-se que seja também analisada a negatificação da baciloscopia para desconsiderar o contágio (BRASIL, 2011a).

As drogas usadas, nos esquemas padronizados, são as seguintes: Isoniazida (H), Rifampicina (R), Pirazinamida (Z) e Etambutol (Et). A recomendação do esquema básico é de Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol na primeira fase do tratamento durante dois meses (fase de ataque) seguidos de Rifampicina e Isoniazida durante quatro meses (fase de manutenção), mantendo dessa forma o regime de curta duração de seis meses. Existem ainda esquemas específicos para casos da forma meningoencefálica e para os casos de falência do esquema básico, sendo que o paciente deve ser encaminhado à unidade de referência para avaliação e definição do esquema terapêutico a ser instituído baseado no teste de sensibilidade aos fármacos (BRASIL, 2009).

Em 1979, o Brasil preconizou um sistema de tratamento para a TB composto pelo Esquema I para os casos novos; Esquema I reforçado para retardamentos; Esquema II para a forma meningoencefálica; e Esquema III para falência. Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com o seu comitê técnico assessor, reviu o sistema de tratamento da TB no Brasil, introduzindo o etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema básico. A apresentação farmacológica passa a ser em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos (RHZEt), nas seguintes dosagens: R 150mg, H 75mg, Z 400mg e Et 275mg. Também foi extinto o Esquema I reforçado e o Esquema III. Nos casos que evoluem para falência do tratamento,

deve ser feita uma avaliação quanto ao histórico terapêutico, adesão aos tratamentos anteriores e comprovação de resistência aos medicamentos (BRASIL, 2011a).

A terapia combinada com várias drogas é essencial para diminuir a incidência de resistência durante o tratamento. A seleção de mutantes resistentes pode ocorrer quando os pacientes são tratados inadequadamente ou são expostos, mesmo que transitoriamente a doses sub-terapêuticas levando à pressão seletiva para emergência e manutenção de microrganismos resistentes (MATHEMA *et al.*, 2006). Deve-se avaliar a evolução do tratamento, realizando-se o controle bacteriológico, de preferência mensalmente e, obrigatoriamente, ao término do segundo, quarto e sexto meses de tratamento. Para todos os pacientes com baciloscopia positiva ao final do 2º mês de tratamento, deverá ser solicitada a cultura e o teste de sensibilidade (BRASIL, 2011a). As drogas usadas no tratamento da tuberculose destroem as micobactérias patogênicas, mas paradoxalmente, podem selecionar os microrganismos resistentes para os quais as drogas tornam-se ineficientes (JOHNSON *et al.*, 2006).

O sucesso do tratamento está fortemente ligado ao diagnóstico precoce da doença. Esta afirmativa se torna verdadeira quando observado o grande aumento de bactérias resistentes aos antibióticos utilizados. Uma terapia correta e iniciada em um período adequado favorece aos indivíduos, no que diz respeito a uma maior possibilidade de cura, e a saúde pública do país, pois diminui os casos bacilíferos responsáveis pela transmissão.

O tratamento da tuberculose é de responsabilidade do governo, portanto um diagnóstico em um menor tempo possível também deve ser prioridade do sistema de saúde. Todos os Estados do Brasil possuem laboratórios de saúde pública, e os mesmos são responsáveis por uma série de análises, incluindo a detecção da tuberculose. O investimento em equipamentos e em capacitação dos profissionais da rede pública de saúde é de extrema importância para a diminuição nos níveis de prevalência desta doença que a tanto tempo assola o mundo inteiro.

A relevância deste projeto reside no fato de que é imperativo demonstrar a possibilidade da substituição de uma metodologia, embora já consagrada nas instituições de todo país, por outra que possa trazer benefícios para toda a população.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar o método para o diagnóstico da tuberculose por meio da utilização do equipamento automatizado BACTEC MGIT 960 e da metodologia manual do meio de cultura Löwenstein-Jensen.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar o tempo necessário para um resultado positivo na metodologia automatizada e na manual.
- Avaliar a positividade da baciloscopia em relação as diferentes amostras clínicas.
- Comparar os tempos necessários para a positividade em cada uma das metodologias, tendo como parâmetro de comparação o resultado da baciloscopia.
- Avaliar qual metodologia apresentou um maior número de contaminantes.
- Avaliar qual material clínico apresentou uma maior contaminação para cada metodologia de cultivo.
- Avaliar qual método apresentou um maior aumento na detecção de casos positivos de micobactérias.
- Avaliar a concordância entre os resultados obtidos em um sistema automatizado (BACTEC MGIT 960) e uma metodologia manual (Löwenstein-Jensen) para a detecção da tuberculose.
- Avaliar a distribuição das micobactérias tuberculosas e não tuberculosa entre as duas metodologias.
- Avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo de um método de automação e da cultura manual em relação à baciloscopia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local e desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo e experimental para avaliação de dois testes diagnósticos (manual e automatizado) pelos quais amostras de aspirado brônquico-alveolar, aspirado traqueal, biópsia, escarro, líquido ascítico, líquido brônquico-alveolar, LCR, lavado gástrico, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido sinovial, sangue, abscesso, secreções, urina e material de úlceras, encaminhadas para a realização de cultura no laboratório de Nível de Biossegurança III (NB III) do Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN), foram analisadas. A pesquisa teve suas amostras coletadas no período de julho a setembro de 2011. A pesquisa foi acompanhada por um farmacêutico-bioquímico com experiência no diagnóstico da tuberculose. As amostras foram fornecidas por pacientes, de várias Unidades de Saúde do Estado, que necessitavam de cultura para confirmação ou controle da tuberculose.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas todas as amostras de aspirado brônquico-alveolar, aspirado traqueal, biópsia, escarro, líquido ascítico, líquido brônquico-alveolar, LCR, lavado gástrico, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido sinovial, sangue, abscesso, secreções, urina e material de úlceras que continham quantidade suficiente para a realização das duas metodologias (manual e automatizada) analisadas e que tiveram os critérios adequados de coleta, armazenamento e transporte. O material clínico deve estar devidamente rotulado, embalado e transportado. Se a embalagem ou recipiente com o material não estivesse íntegro o material foi rejeitado. Considerando que as amostras participantes da pesquisa foram provenientes da rotina do laboratório e que o mesmo faz um intenso e constante treinamento com as Unidades de Saúde, nenhuma amostra foi considerada inadequada para o estudo.

4.3 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao comitê de ética e pesquisa humana na Plataforma Brasil. A presente pesquisa não acarretou danos para a saúde dos participantes por utilizar amostras que já seriam coletadas para a análise de diagnóstico ou de avaliação de tratamento. Foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.4. Metodologia

A metodologia para as análises laboratoriais utilizadas para a realização desta pesquisa foi retirada do Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias (BRASIL, 2008), sendo este uma referência do Ministério da Saúde e que é utilizada na rotina do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN).

4.4.1 Preparação das Amostras

Os agentes químicos (ácidos e bases) liberam as micobactérias do muco e da fibrina ou dos tecidos em que estão incluídos, homogeneizando a amostra clínica e eliminando diversos microrganismos da mesma. A eliminação destes proporciona o crescimento das micobactérias, sem a competição pelos nutrientes contidos nos meios de cultura. O método de Petroff modificado utiliza solução de NaOH a 4% como agente de fluidificação-descontaminação e igual volume do material, chegando a uma concentração final de NaOH 2%. É indicada principalmente para amostras de escarro.

As amostras foram preparadas pelo método de fluidificação-descontaminação (método de Petroff Modificado). As amostras foram transferidas, no máximo 5 mL, para tubos de centrífugas com capacidade de 50 mL, deixando escorrer suavemente o material pela parede dos tubos. Foi adicionada com pipeta estéril a cada um dos tubos o NaOH 4%, na quantidade correspondente ao mesmo volume da amostra. Os tubos foram agitados manualmente até formar uma mistura bem homogênea e mantidos em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Foi utilizada água destilada para completar os volumes a 50 mL. A neutralização

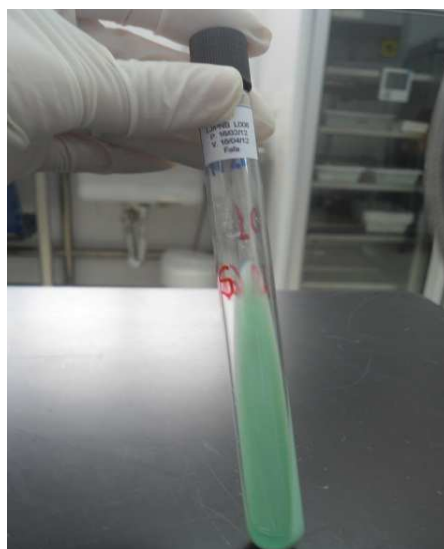
foi realizada gotejando a solução neutralizante de vermelho de fenol até o material apresentar a cor amarela âmbar. Após cada gota, o material foi agitado suavemente para homogeneizar. A cor amarela âmbar indica que houve mudança do pH para a faixa entre 6,5 e 7,2 e que a amostra está adequada para ser semeada. Ao final do processo, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos.

Os métodos de cultivo são metodologias sensíveis para o diagnóstico da TB, seja pulmonar ou extrapulmonar. Permitem o crescimento e o isolamento do agente etiológico, a partir de semeadura da amostra clínica em meios de cultura específicos para micobactérias. Durante o experimento, foram utilizados dois tipos de meio de cultura: o meio sólido à base de ovo (meio Löwenstein-Jensen, método manual) e o meio líquido (meio líquido *Middlebrook 7H9*, sistema automatizado BACTEC MGIT 960).

4.4.2 Cultura em meio sólido (Löwenstein-Jensen - LJ) – Método manual

O sobrenadante formado durante a centrifugação de cada tubo foi desprezado. Um volume de 0,1 mL do precipitado disposto na parte inferior de cada tubo foi inoculado, utilizando uma pipeta estéril, nos tubos contendo o meio sólido de forma que o inóculo banhasse toda a superfície do meio (Figura 10).

Figura 10 - Meio de Cultura Löwenstein-Jensen



Fonte: Arquivo pessoal.

Para cada uma das amostras, foram semeados dois tubos de LJ e um tubo de LJ suplementado com PNB (ácido *p*-nitrobenzóico) (LJ-PNB), os quais foram inclinados em uma bandeja de polipropileno (Figura 11), de maneira que o lado da tampa permanecesse ligeiramente mais alto e com a superfície do meio voltada para cima. O LJ-PNB é um meio que inibe o crescimento do *M. tuberculosis*, mas não as micobactérias atípicas. Portanto, a ausência de crescimento do *M. tuberculosis* no meio LJ-PNB, confirma o crescimento deste microrganismo em especial.

Foi preparado o esfregaço para baciloscopia depositando duas gotas do sedimento na lâmina no mesmo momento do cultivo nos meios de cultura. As lâminas foram dispostas sobre uma chapa aquecedora dentro da cabine de segurança biológica para evitar a disseminação de aerossóis. Os tubos de meio de cultura foram fechados, sem rosquear a tampa até o final.

Figura 11 - Tubos com meio LJ inoculados



Fonte: Arquivo pessoal.

Após a realização das etapas de fluidificação-descontaminação e semeadura nos meios de cultura, esses foram colocados em temperaturas apropriadas e constantes, de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por um tempo de incubação necessário ao desenvolvimento de micobactérias. Nos meios de cultura sólidos, as colônias de micobactérias podem ser visualizadas a olho nu, entre 3 e 7 dias (espécies de crescimento rápido) ou após 7 dias (espécies de crescimento lento). Após 48 horas de incubação, foi verificada a presença de contaminação (presença de colônias

microbianas – bactérias ou fungos) pela mudança de coloração ou liquefação dos meios. Quando presentes, os tubos foram descartados. Os tubos que não apresentaram contaminação ou alteração do meio tiveram suas tampas completamente rosqueadas e foram incubados novamente.

As leituras posteriores foram realizadas de 7 em 7 dias (leituras semanais), até completar 8 semanas. O tempo de incubação das amostras variou com o resultado apresentado: amostras que se apresentaram contaminadas foram descartadas e uma nova amostra foi solicitada, amostras com o resultado positivo foram retiradas e os resultados foram registrados, amostras negativas permaneceram na estufa por um período de até o final das 8 semanas.

4.4.3 Cultura em meio líquido 7H9 – Método automatizado BACTEC MGIT 960

O BACTEC MGIT 960 (Figura 13) é um equipamento que utiliza um sistema totalmente automatizado que utiliza um tubo indicador de crescimento de micobactérias com 7 mL de meio de cultura líquido *Middlebrook* 7H9 suplementado com albumina, dextrose e catalase.

Figura 12 - Equipamento BACTEC MGIT 960



Fonte: Arquivo pessoal.

O método BACTEC MGIT 960 baseia-se no consumo de O₂ pelos microrganismos metabolicamente ativos. O meio líquido tem na base silicone impregnado com um sensor químico para oxigênio, o cloridrato pentahidratado de fenantrolina de rutênio. Este composto emite luz laranja quando ocorre consumo de oxigênio dissolvido no meio de cultura e esta é detectada quando incide uma luz ultravioleta 365 nm. Para a realização da análise, é primeiramente adicionado ao tubo 0,8 mL do suplemento e em seguida 0,5mL da amostra. Os tubos inoculados são acondicionados em bandejas de incubação e colocados no equipamento.

Juntamente com o processamento das amostras no equipamento, é feita a lâmina da baciloscopia e um tubo de LJ-PNB. Este procedimento visa a caracterização das micobactérias tuberculosas das não tuberculosas, considerando que o BACTEC MGIT 960 não faz esta diferenciação, apenas indica o crescimento bacteriano. Na lâmina de baciloscopia, é visualizado o fator corda, típico do *Mycobacterium tuberculosis*, e o crescimento no tubo de LJ-PNB sugere a presença de micobactérias não-tuberculosas (MNT). Para a diferenciação entre as espécies, as amostras são encaminhadas para o laboratório de referência nacional Professor Hélio Fraga no Rio de Janeiro.

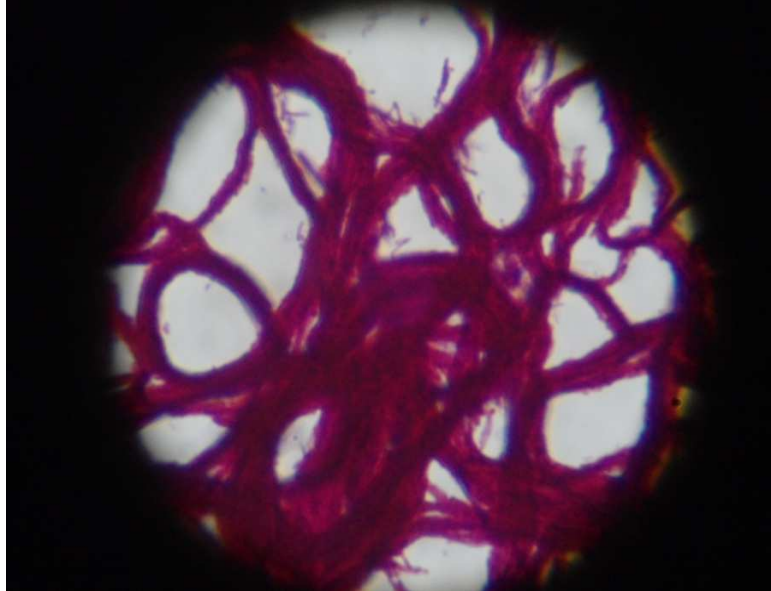
4.4.4 Baciloscopia

Concomitantemente a inoculação nos meios de cultura foi realizada a baciloscopia das amostras. Com a pipeta, foram pingadas duas gotas de cada amostra sobre as lâminas dispostas sobre a chapa aquecedora. Enquanto os meios eram semeados, as lâminas eram fixadas. Este procedimento foi realizado dentro da cabine de segurança biológica, evitando a dispersão de aerossóis. Os potes com as amostras já processadas foram armazenados, até a liberação dos resultados, para o caso ser necessário repetir a baciloscopia ou a cultura, entretanto, em muitos casos o procedimento utilizou toda a amostra disponível. Depois de fixados, os esfregaços ficaram aderidos às lâminas e passaram pelo processo de coloração.

As lâminas foram cobertas pela fucsina fenicada a 0,3% e, em seguida, foram fixadas sobre a chama do bico de Bunsen até que a emissão de vapores visíveis. As lâminas foram lavadas com água corrente e, posteriormente, foram cobertas com uma solução descorante de álcool-ácido a 3%. Após a descoloração, as lâminas foram cobertas com azul de metileno a 0,3% e, após 30 segundos, foram lavadas com água corrente e deixadas para secar.

Após a coloração, as lâminas foram visualizadas ao microscópio ótico, em objetiva de imersão (aumento de 1000x) (Figura 14).

Figura 13 - Lâmina de baciloscopia (aumento de 1000x)



Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.5 Análises Estatísticas

Os resultados foram inseridos em uma planilha Excel e analisados pelo programa IBM SPSS *Statistics*. Foram analisadas as variáveis procedência, tipo de material clínico, resultado da leitura da lâmina de baciloscopia, resultado da cultura de MGIT e do LJ, tempo necessário para a positivação nas metodologias manual e automatizada. Das variáveis estudadas, foi realizada uma distribuição quantitativa dos dados encontrados.

Para a comparação das diferenças nas frequências de resultados positivos e negativos nos grupos estudados foi empregado o teste do qui-quadrado. Resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Para comparação dos tempos médios de detecção foi feita a mediana e o desvio padrão no programa Excel e no IBM SPSS *Statistics* foi elaborado o gráfico onde os resultados foram distribuídos em percentis. O teste de kappa foi utilizado para avaliar o grau de concordância entre os testes, sendo calculado através da

metodologia encontrada no endereço eletrônico <http://www.chestx-ray.com/Statistics/kappa.html>.

A interpretação do Kappa foi realizada da seguinte forma: se menor que 0, não há concordância, entre 0 e 0,2 concordância insignificante, entre 0,21 e 0,4, razoável, entre 0,41 e 0,6, moderado, entre 0,61 e 0,8, substancial e entre 0,81 e 1 quase perfeito.

5 RESULTADOS

Durante o período do estudo, foram analisadas 1.520 amostras de diversos espécimes clínicos: aspirado brônquico-alveolar, aspirado traqueal, biópsia, escarro, líquido ascítico, LCR, lavado gástrico, líquido pericárdico, líquido sinovial, líquido brônquico-alveolar, líquido pleural, sangue, abscesso, secreções, urina e material de úlceras.

Em relação à procedência das amostras, ou seja, o município de origem, Fortaleza foi a cidade com a maior quantidade de espécimes clínicos, com 726 (47,76%). Das cidades do interior do Estado, Caucaia apresentou a maior quantidade de espécimes clínicos, com 446 (29,34%) (Tabela 1, Anexo A).

Tabela 1 - Distribuição das amostras de espécimes clínicos analisados (n=1.520), segundo a procedência (capital e interior).

Origem	N	%
Fortaleza	726	47,76
Caucaia	446	29,34
Ocara	75	4,93
Paracuru	67	4,41
Paraipaba	37	2,43
Sobral	31	2,04
São Gonçalo do Amarante	22	1,45
Russas	12	0,79
Pacatuba	10	0,66
São Benedito	9	0,59
Camocim	8	0,53
Iguatu	6	0,39
Itapajé	6	0,39
Otavio Lobo	5	0,33
Canindé	4	0,26
Itapipoca	4	0,26
Limoeiro do Norte	4	0,26

Tabela 1 - Distribuição das amostras de espécimes clínicos analisados (n=1.520), segundo a procedência (capital e interior). Continua.

Pentecoste	4	0,26
Aracati	3	0,20
Graça	3	0,20
Guaramiranga	3	0,20
Mucambo	3	0,20
Santana do Acaraú	3	0,20
Beberibe	2	0,13
Coreaú	2	0,13
Frecheirinha	2	0,13
Jucás	2	0,13
Maranguape	2	0,13
Mombaça	2	0,13
Monsenhor Tabosa	2	0,13
Quixeramobim	2	0,13
Uruburetama	2	0,13
Acopiara	1	0,07
Governador Sampaio	1	0,07
Granja	1	0,07
Ipú	1	0,07
Itarema	1	0,07
Marco	1	0,07
Pindoretama	1	0,07
Quixadá	1	0,07
Quixeré	1	0,07
Tauá	1	0,07
Tururu	1	0,07
TOTAL	1.520	100

N = número de amostras

No município de Fortaleza, a procedência das amostras está relacionada com a Unidade de Saúde de origem. O Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) recebe

amostras provenientes tanto de hospitais quanto de postos de saúde. O Hospital Geral de Fortaleza (HGF) encaminhou para análise o maior número de amostras, 244 (33,61%), seguido pelo Hospital Infantil Albert Sabin, com 97 espécimes, representando 13,36% do total (726). Dos postos de saúde, o Posto de Saúde Flávio Marcílio, foi o que encaminhou o maior número de amostras com um total de 52 espécimes (7,16%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição das amostras de espécimes clínicos analisados provenientes de Fortaleza (n=726), segundo hospitais e postos de saúde de origem.

Unidade de Saúde de origem em	N	%
Fortaleza		
HGF	244	33,61
HIAS	97	13,36
HPOL	84	11,57
LACEN	66	9,09
HMM	59	8,13
Flávio Macílio		
CDDL	36	4,96
HUWC	36	4,96
SVO	13	1,79
HM	10	1,38
HNSGA	10	1,38
CIDH	9	1,24
HDEAM	5	0,69
Ainda Santos		
HSJ	2	0,28
TOTAL	726	100

Hospitais: HGF: Hospital Geral de Fortaleza; HIAS: Hospital Infantil Albert Sabin; HMM: Hospital Municipal de Messejana; HUWC: Hospital Universitário Walter Cantídio; HM: Hospital Militar; HSJ: Hospital São José. **HDEAM:** Hospital Dr. Evandro Ayres Moura; **HNSGA:** Hospital Nossa Senhora das Graças; **Outros:** CIDH: Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão; CDDL: Centro de Dermatologia Dona Libânia; HPOL: Hospital Penal Otávio Lobo; SVO: Serviço de Verificação de Óbito; LACEN: Laboratório Central de Saúde Pública. N = número de amostras

Considerando que a tuberculose apresenta-se na forma pulmonar e extrapulmonar, e que diversos tipos de amostras podem ser utilizados para o diagnóstico, foi feita a distribuição quantitativa relacionada com a variabilidade dos espécimes clínicos analisados. As amostras respiratórias: escarro, líquido pleural, líquido brônquico-alveolar, aspirado brônquico-alveolar e aspirado traqueal somaram um total de 1.175 amostras (77,3%). Dentre os espécimes analisados, o escarro foi o representante com a maior quantidade, 1.072 amostras (70,53%), seguido da urina com 167 amostras (10,99%) e do lavado gástrico, 100 amostras (6,58%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição quantitativa das amostras de espécimes clínicos analisados (n=1.520).

Material Clínico	N	%
Escarro	1.072	70,53
Urina	167	10,99
Lavado gástrico	100	6,58
Líquido brônquico-alveolar	47	3,09
Líquido pleural	34	2,24
Biópsia	27	1,78
LCR	24	1,58
Aspirado traqueal	21	1,38
Líquido ascítico	8	0,53
Líquido sinovial	5	0,33
Secreção	5	0,33
Sangue	4	0,26
Líquido pericárdico	2	0,13
Material de Úlcera	2	0,13
Aspirado brônquico-alveolar	1	0,07
Abcesso	1	0,07
TOTAL	1.520	100

LCR: Líquido cefalorraquidiano. N = número de amostras

Nas detecções de bacilos álcool-ácido resistentes, por baciloscopia, 188 (12,37%) amostras apresentaram-se positivas e 1.332 (87,63%) negativas. Nas culturas em meio sólido

(LJ), por metodologia manual, 254 (16,71%) amostras foram positivas, 1.156 (76,05%) negativas e 110 (7,24%) apresentaram contaminação. Na metodologia automatizada (MGIT), o resultado foi de 258 (16,97%) positivas, 1.149 (75,59%) negativas e 113 contaminadas (7,43%) (Tabela 4). Para esta análise, cada método foi avaliado independentemente.

Tabela 4 – Distribuição dos resultados obtidos para as amostras de espécimes clínicos analisados (n=1520), por baciloscopia e cultura (metodologia manual e automatizada).

	Baciloscopia		Manual (LJ)		Automação (BACTEC)	
	N	%	N	%	N	%
Positivos	188	12,37	254	16,71	258	16,97
Negativos	1.332	87,63	1.156	76,05	1.149	75,60
Contaminados	0	0,00	110	7,24	113	7,43
TOTAL	1.520	100	1.520	100	1.520	100

N = número de amostras

Os dois métodos de cultivo realizados necessitam de tempos diferentes para fornecer um resultado. A mediana do tempo necessário para positividade no método manual foi de 31,95 dias, com desvio médio de 15,01 e na metodologia automatizada foi de 16,53 dias, com desvio padrão de 12,39.

De cada uma das metodologias, foi feita uma distribuição, em percentis, da quantidade de amostras que se apresentaram como positiva. No gráfico 1, as amostras são distribuídas de acordo com os dias necessários para a positividade. Para esta análise, cada metodologia foi avaliada individualmente, com isso, no caso da automação, foram avaliadas as 258 amostras com resultado positivo e no caso da metodologia manual a quantidade foi de 254.

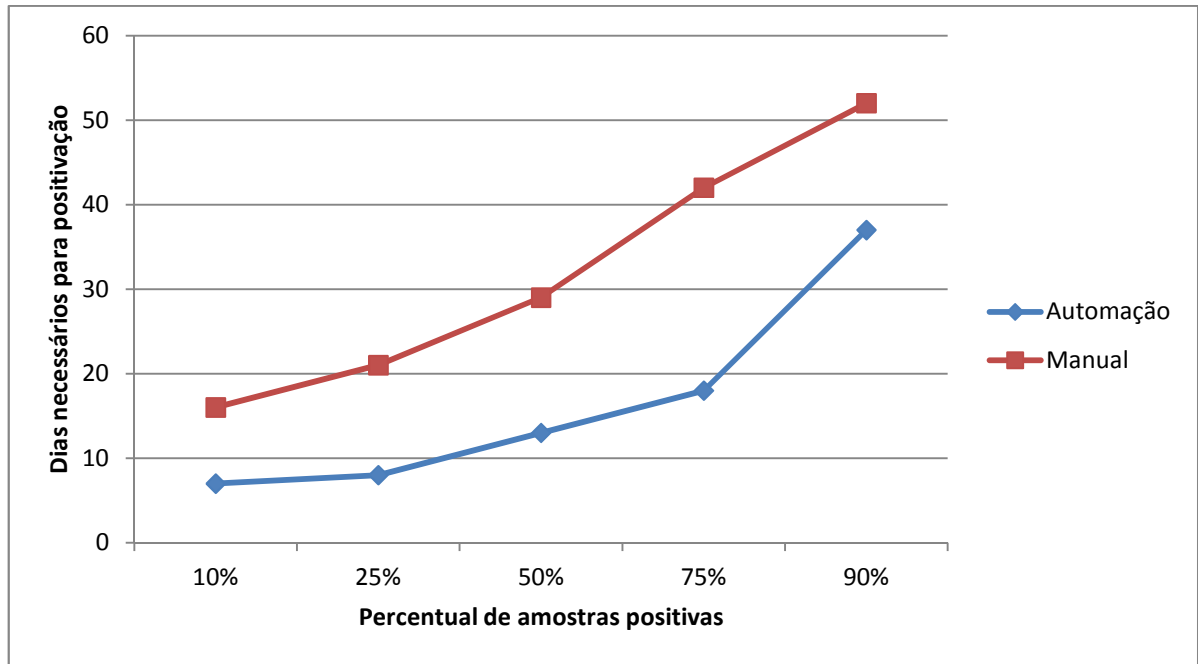


Gráfico 1 - Tempo necessário para positivação das amostras de espécimes clínicos analisadas nas duas metodologias de cultivo (manual: n= 254; automatizada: n=258) distribuídas por percentil.

Considerando a positividade para a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (n=188), apenas cinco tipos de espécimes (escarro, aspirado traqueal, líquido pleural, líquido brônquico-alveolar e aspirado brônquico-alveolar), resultaram em amostras positivas na baciloscopia (Tabela 5). O material clínico com a maior porcentagem que indica a presença de bacilos álcool-ácido resistentes nas amostras positivas na baciloscopia foi o aspirado traqueal com 23,5%, seguido do escarro com 19,9%, quando cada um dos tipos clínicos é comparado com o total de amostras analisadas.

Tabela 5 - Presença de bacilos álcool-acido resistentes nas amostras de espécimes clínicos analisados

Material Clínico	Baciloscopia		
	Positivo	Negativo	% de positividade
Escarro	178	894	16,60
Aspirado traqueal	4	17	19,05
Líquido pleural	3	31	8,82
Líquido brônquico-alveolar	2	45	4,26
Aspirado brônquico-alveolar	1	0	100,00
Biopsia	0	27	0,00
Líquido ascítico	0	8	0,00
LCR	0	24	0,00
Lavado gástrico	0	100	0,00
Líquido pericárdio	0	2	0,00
Líquido sinovial	0	5	0,00
Sangue	0	4	0,00
Abcesso	0	1	0,00
Secreção	0	5	0,00
Urina	0	167	0,00
Úlcera	0	2	0,00
TOTAL	188	1.332	1.520

N = número de amostras

Quando as amostras clínicas são analisadas individualmente, ou seja, quando é verificada a positividade em relação ao total de amostras colhidas de um tipo em especial, a maior positividade encontrada foi o do aspirado brônquico-alveolar, com uma taxa de 100%, e, seguida, o aspirado traqueal, com 19,05%.

O tempo necessário para a positividade das amostras analisadas nos métodos de cultivo foi correlacionado com o resultado da baciloscopia (Tabelas 6 e 7). Para este procedimento, as amostras foram separadas por metodologia, em seguida, para cada método, foi avaliado o tempo necessário para que as amostras tivessem resultados positivos dependendo do resultado da baciloscopia, positivas e negativas.

Quando foram correlacionados os resultados de baciloscopia com a metodologia automatizada (Tabela 6), foi encontrado um tempo médio de 10 dias para a positivação das amostras com baciloscopia positiva e de 16 dias para aquelas com baciloscopia negativa. Na correlação dos resultados de baciloscopia e de cultivo por metodologia manual (Tabela 7), um tempo médio de 21 dias foi constatado para a positivação das amostras com baciloscopia positiva e de 24,5 dias para as amostras com baciloscopia negativas.

Tabela 6 - Correlação entre o resultado da baciloscopia e o tempo de positivação das amostras de espécimes clínicos analisadas na metodologia automatizada (Cultura em meio líquido 7H9)

Metodologia Automatizada			
Baciloscopia	Amostras	Tempo médio	Desvio Padrão
Positivo	153	10	10,4
Negativo	105	16	10,1
TOTAL	258	-	-

Total de amostras não contaminadas no método automatizado = 1.407. N = número de amostras

Tabela 7 - Correlação entre o resultado da baciloscopia e o tempo de positivação das amostras de espécimes clínicos analisadas na metodologia manual (Cultura em meio sólido LJ)

Metodologia Manual			
Baciloscopia	Amostras	Tempo médio	Desvio Padrão
Positivo	148	21	16,37
Negativo	106	24,5	14,4
TOTAL	254	-	-

Total de amostras não contaminadas no método automatizado = 1.410 N = número de amostras

É possível avaliar o aumento do número de amostras positivadas quando foi acrescida a cultura as análises de baciloscopia. Na metodologia manual, houve um acréscimo no rendimento de 16,71% no número de amostras positivas e, na metodologia automatizada, houve um acréscimo de 16,97%.

A análise das contaminações mostrou que 121 amostras (7,96%) do total apresentaram contaminação em pelo menos uma das metodologias. 102 (6,71%) dos espécimes clínicos analisados apresentaram contaminação em ambos os métodos. 8 amostras (0,53%) apresentaram-se como contaminadas no método manual, mas não na automação. 11 (0,72%) contaminaram no método automatizado e não no manual. 1.399 amostras, representando um total de 92,04% das amostras analisadas, não apresentaram contaminação em nenhuma das metodologias (Tabela 8).

Tabela 8 - Correlação entre a ocorrência de contaminação nas culturas das amostras de espécimes clínicos analisados pelas metodologias realizadas (manual e automatizada).

	LJ Contaminado		LJ Não Contaminado		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
MGIT Contaminado	102	92,73	11	0,78	113	7,43
MGIT Não Contaminado	8	7,27	1.399	99,22	1.407	92,57
TOTAL	110	100	1.410	100	1.520	100

($p < 0,001$). N = número de amostras

Quando o tipo de amostra clínica analisado é relacionado com presença de contaminação e com a metodologia utilizada, é possível observar que na automação a amostra que apresentou o maior número de contaminantes foi o escarro (76,11%), seguido do líquido brônquico-alveolar (8,85%) e a urina, 6 amostras (5,31%). Quando analisada a metodologia manual, o escarro representou 76,36% (84) das amostras com contaminação. Em seguida, o líquido brônquico-alveolar com 10 espécimes (9,09%) e a urina, 6 amostras (5,45%) (Tabela 9).

Figura 14 – Tubos contendo meio LJ contaminados



Fonte: Arquivo pessoal.

Em relação à coloração do meio, os tubos 1, 2, 5 e 7 mostraram nitidamente uma coloração azulada, diferindo da cor original verde claro do LJ (Figura 10). Considerando a morfologia, as colônias de *M. tuberculosis* têm o formato de couves-flores, são secas, branco-acinzentadas. O tubo 3 apresenta colônias amarelo-amarronzadas e os tubos 4, 5 e 6 apresentam colônias brancas com aspecto viscoso, diferente das características originais do *M. tuberculosis*. A cor esbranquiçada indica a ocorrência de alcalinização e a cor verde acidificação (Brasil, 2005).

Tabela 9 – Correlação entre o material clínico analisado e a ocorrência de contaminação nas culturas na metodologia manual (LJ) e na metodologia automatizada (MGIT).

	Metodologia Manual		Metodologia Automatizada	
	N	%	N	%
Aspirado Traqueal	3	2,73	3	2,65
Biópsia	1	0,91	1	0,88
Escarro	84	76,36	86	76,11
Lavado Gástrico	2	1,82	3	2,65
LCR	1	0,91	1	0,88
Líquido Ascítico	2	1,82	2	1,77
Líquido Brônquico-alveolar	10	9,09	10	8,85
Secreções	1	0,91	1	0,88
Urina	6	5,45	6	5,31
Abcesso	0	0	0	2,65
Aspirado brônquico-alveolar	0	0	0	0,88
Líquido pericárdico	0	0	0	76,11
Líquido pleural	0	0	0	2,65
Líquido sinovial	0	0	0	0,88
Sangue	0	0	0	1,77
TOTAL	110	100	113	100

N = número de amostras

Para as análises de comparação entre os métodos manual e automatizado, as duas metodologias foram avaliadas em conjunto, portanto foram excluídas 121 amostras, por estas apresentarem contaminação. Estas amostras foram excluídas das análises feitas em ambos os métodos, mesmo apresentando contaminação em apenas um deles. Foram identificadas 246 amostras positivas em ambos o métodos (17,58%), 6 amostras positivas na metodologia automatizada e o mesmo valor, 6, na metodologia manual(0,43%) e 1141 negativas em ambas

as análises (81,56%), com diferenças estatisticamente significativa entre os dois meios de cultura testados (Tabela 10).

Tabela 10 - Correlação entre os resultados das culturas na metodologia manual (LJ) e na metodologia automatizada (MGIT).

		Metodologia Manual					
		Positivo		Negativo		TOTAL	
		N	%	N	%	N	%
Metodologia	Positivo	246	97,62	6	0,52	252	18,01
Automatizada	Negativo	6	2,38	1141	99,48	1147	81,99
TOTAL		252	100	1147	100	1399	100

($p < 0,001$). N = número de amostras

Realizando-se a análise da correlação entre as duas metodologias, observou-se uma alta concordância (Kappa de 0,97). A sensibilidade do método automatizado em relação ao manual foi de 0,97, a especificidade de 0,99, o valor preditivo positivo igual a 0,97, o valor preditivo negativo, 0,99 e a acurácia de 0,99. A razão de verossimilhança foi de 0,96 (Tabela 11).

Tabela 11 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e razão de verossimilhança da metodologia automatizada em relação à metodologia manual.

Parâmetros	Metodologia Automatizada
Sensibilidade	0,97
Especificidade	0,99
Valor Preditivo Positivo	0,97
Valor Preditivo Negativo	0,99
Acurácia	0,99
Razão de Verossimilhança	0,96

N = número de amostras

Das amostras positivas, 26 espécimes (89,66%) mostraram-se como micobactérias não-tuberculosas (MNT) em ambas as metodologias. Considerando apenas a automação 10 amostras apresentaram resultado como MNT. Na cultura em LJ, 3 amostras foram identificadas como atípicas (Tabela 12).

Tabela 12 - Correlação entre os resultados das culturas na metodologia manual (meio LJ) e na metodologia automatizada (meio *Middlebrook 7H9*), considerando o crescimento de bactérias tuberculosas e não-tuberculosas e a ocorrência de contaminação.

		Metodologia Manual									
		Positivo*		Negativo		Contaminação		MNT		TOTAL	
		N	%	N	%	N	%	N	%		
Metodologia Automatizada	Positivo*	214	95,11	2	0,17	4	3,64	2	6,90	222	
	Negativo	5	2,22	1.141	98,70	2	1,82	1	3,45	1149	
	Cont.	2	0,89	9	0,78	102	92,73	0	0,00	113	
	MNT	4	1,78	4	0,35	2	1,82	26	89,66	36	
	TOTAL	225	100	1.156	100	110	100	29	100	1.520	

MNT – Micobactérias não-tuberculosas. * Presença de *M. tuberculosis*. N = número de amostras

Correlacionando os resultados obtidos para baciloscopia e metodologia automatizada (Tabela 13), constatamos a ocorrência de 153 (87,43%) amostras positivas em ambos os testes, 22 (12,57%) amostras positivas na baciloscopia e negativa na cultura, 105 (8,52%) amostras positiva na cultura e negativa na baciloscopia e 1.127 (91,48%) amostras negativas em ambas as metodologias com diferenças estatisticamente significativas entre os métodos. A sensibilidade do método de cultivo automatizado em relação à baciloscopia foi de 0,87, a especificidade de 0,91, o valor preditivo positivo de 0,59 e o valor preditivo negativo de 0,91 (Tabela 14).

Tabela 13 - Correlação entre a metodologia automatizada e a baciloscopia.

		Baciloscopia					
		Positivo		Negativo		TOTAL	
		N	%	N	%	N	%
Metodologia Automatizada	Positivo	153	87,43	105	8,52	258	18,34
	Negativo	22	12,57	1.127	91,48	1.149	81,66
TOTAL		175	100	1.232	100	1.407	100

Total de amostras não contaminadas no método automatizado = 1.407. (p<0,001). N = número de amostras

Tabela 14 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo das metodologias manual e automatizada em relação à baciloscopia.

Parâmetros	Metodologia Automatizada	Metodologia Manual
Sensibilidade	0,87	0,85
Especificidade	0,91	0,91
Valor Preditivo Positivo	0,59	0,58
Valor Preditivo Negativo	0,91	0,97

N = número de amostras

Na correlação entre a baciloscopia e a metodologia manual, foram positivas em ambos os testes um total de 148 (85,55%) amostras, 25 (14,45%) amostras foram positivas na baciloscopia e negativas na cultura, 106 (8,57%) amostras foram positivas na cultura e negativas na baciloscopia e 1.131 (91,43%) amostras foram negativas em ambas as metodologias, com diferenças estatisticamente significantes entre ambos os métodos (Tabela 15). A sensibilidade do método em relação à baciloscopia foi de 0,85, a especificidade de 0,91, o valor preditivo positivo de 0,59 e o valor preditivo negativo de 0,91 (Tabela 14).

Tabela 15 - Correlação entre a metodologia manual e a baciloscopia.

		Baciloscopia					
		Positivo		Negativo		TOTAL	
		N	%	N	%	N	%
Metodologia	Positivo	148	85,55	106	8,57	254	18,01
Manual	Negativo	25	14,45	1131	91,43	1156	81,99
TOTAL		173	100	1237	100	1410	100

Total de amostras não contaminadas no método automatizado = 1.410. ($p < 0,001$). **N** = número de amostras

6 DISCUSSÃO

A tuberculose continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo inteiro, apresentando o Brasil, um perfil epidemiológico semelhante. Este fato deve-se a carência populacional no que diz respeito a saúde e educação, considerando que a TB pode ser prevenida e tratada. Apesar dos inúmeros esforços relativos ao desenvolvimento de tratamentos, a enfermidade apresenta uma presença marcante em todo o país. Embora haja diversas metodologias para o diagnóstico da doença, incluindo testes precisos de biologia molecular, a cultura em meio Löwenstein-Jensen continua bastante difundida em todo o território brasileiro, a despeito do longo tempo necessário para o resultado diagnóstico do paciente.

O Estado do Ceará exhibe um grande número de casos de tuberculose, tanto na capital quanto no interior. Um diagnóstico rápido e seguro é de extrema importância não só para a identificação da doença, mas também na sua detecção precoce. Tendo em vista melhores resultados, o Laboratório Central de Saúde Pública adquiriu um equipamento de automação, objetivando uma maior rapidez no reporte dos resultados.

Neste estudo a metodologia automatizada, utilizando o equipamento BACTEC MGIT 960, foi comparada a metodologia tradicional já utilizada e consagrada pela OMS, a cultura em meio sólido Löwenstein-Jensen (LJ). Procurou-se avaliar se a automação poderia substituir com a mesma eficiência a cultura manual, auxiliando no diagnóstico, e, por conseguinte, o tratamento e os índices da doença no Estado.

Dos 1.520 espécimes recebidos no laboratório, todos foram considerados elegíveis para os testes iniciais por estarem de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos pela pesquisa. O LACEN recebe amostras de municípios de todas as regiões do interior e da capital. Durante a pesquisa, foram recebidas amostras dos municípios de Fortaleza, Caucaia, Ocara, Paracuru, Paraipaba, Sobral, São Gonçalo do Amarante, Russas, Pacatuba, São Benedito, Camocim, Iguatu, Itapajé, Otávio Lobo, Canindé, Itapipoca, Limoeiro do Norte, Pentecoste, Aracati, Graça, Guaramiranga, Mucambo, Santana do Acaraú, Beberibe, Coreaú, Freicheirinha, Jucás, Maranguape, Mombaça, Monsenhor Tabosa, Quixaramobim, Uruburetama, Acopiara, Governador Sampaio, Granja Ipú, Itarema, Marco, Pindoretama, Quixadá, Quixeré, Tauá e Tururu.

De acordo com o Boletim Epidemiológico – Tuberculose do Ceará (BRASIL, 2012), os municípios de Caucaia, Crato, Fortaleza, Maranguape, Itapipoca, Sobral, Maracanaú e Juazeiro do Norte responderam por 67% dos casos de tuberculose no Estado em 2011. Dentre essas cidades, o estudo recebeu amostras de Caucaia, Fortaleza, Maranguape, Itapipoca e Sobral. Os municípios de Juazeiro do Norte e Crato possuem suas próprias Unidades LACEN, portanto o envio de amostras para o LACEN de Fortaleza só é feito no caso dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos, e a cidade de Maracanaú possui um hospital, o Hospital Municipal João Elísio de Holanda - Hospital de Maracanaú, de grande tradição no diagnóstico e tratamento contra a TB. Os municípios de Fortaleza e Caucaia representaram um total de 1.172 (77,10%) dos casos estudados.

Em relação às Unidades de Saúde instaladas em Fortaleza, o Hospital Geral de Fortaleza (HGF) foi o que participou com o maior número de amostras (33,61%), seguido do Hospital Infantil Albert Sabin (13,36%). Em ambos os casos, os hospitais são bastante representativos em termo de número de atendimentos no Estado. O primeiro se trata de uma Unidade de Atendimento terciário, recebendo pacientes com diversos níveis de complexidade e, o segundo, um hospital pediátrico de grande porte, onde o volume de atendimentos é bastante grande.

O Posto de Saúde com a maior colaboração foi o Flávio Macílio. De acordo com o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), todos os Postos de Saúde podem fazer a distribuição gratuita de medicamentos contra a TB. Entretanto, algumas Unidades, aparecem tradicionalmente, nos últimos 10 anos, como prioritárias no acompanhamento dos pacientes (BRASIL, 2010). No período de 2001 a 2009, o Centro Dermatológico Dona Libânia (CDDL) participou no estado com o maior acompanhamento de pacientes com TB e, em seguida, o Posto de Saúde Flávio Macílio. Em 2009, o CDDL encerrou suas atividades, ficando apenas com os pacientes que já estavam em tratamento, por este motivo, o Posto de Saúde Flavio Macílio foi a Unidade com a maior participação na pesquisa.

A utilização de diversos tipos de materiais biológicos para o diagnóstico da tuberculose vem, em grande parte, do aumento no número de exemplares extrapulomares da doença. Os materiais mais usualmente utilizados para a o diagnóstico da tuberculose são os aspirados, as biópsias, a urina, o líquido pleural, o líquido pericárdico, o líquido peritoneal, o líquido cefalorraquidiano (LCR) e o líquido sinovial (BENTO *et al*, 2011). A escolha do material deve ser representativa do local onde o processo infeccioso está ocorrendo.

As secreções provenientes dos pulmões são o tipo de amostras mais comumente utilizadas para o diagnóstico quando existe a suspeita de TB pulmonar. Colaborando com esta informação, 77,3% das amostras analisadas no presente estudo (1.175) tiveram origem pulmonar, sendo elas: escarro, líquido pleural, líquido brônquico-alveolar, aspirado brônquico-alveolar e aspirado traqueal. A amostra de escarro é o tipo de material clínica mais utilizada para o isolamento de micobactérias, principalmente para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, isto porque é o material de maior riqueza bacilar e de fácil obtenção (BRASIL, 2008). Nos casos onde não é possível a expectoração espontânea do paciente, é feito o procedimento de indução da expectoração através da inalação de uma solução salina hipertônica, à broncofibroscopia (BFC) com lavado brônquico-alveolar (LBA), com a coleta do produto e à realização de aspirado gástrico (BENTO *et al.*, 2011).

A urina é utilizada para o diagnóstico de tuberculose renal (NAPOLI *et al.*, 2011), entretanto não há dados específicos relacionados com este tipo de TB extrapulmonar no Estado do Ceará. Na pesquisa realizada, este material foi o que apresentou a segunda maior quantidade, com 167 amostras (10,99%). O lavado gástrico, apresentando 100 amostras (6,58%), pode ser utilizado nos casos onde o paciente não colabora com a coleta por meio da expectoração, e sua utilização baseia-se na presença do bacilo nas secreções respiratórias deglutidas durante a noite que podem ser acumular no suco gástrico (BENTO *et al.*, 2011).

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é utilizado o diagnóstico das meningites bacterianas, através da cultura, e bacterioscopia. A realização da semeadura em meios de cultura selecionados e a bacterioscopia precisa são importantes para o diagnóstico e o tratamento da meningite, pois permite a identificação do agente causador (FONSECA *et al.*, 2011). No presente estudo, o LCR foi utilizado como amostra analisada em 24 casos (1,58%).

Todas as 1.520 amostras analisada passaram por três processos: a baciloscopia, a cultura em meio sólido (LJ) e em meio líquido (MGIT). A baciloscopia é um teste de rotina utilizado em conjunto com a cultura que, no presente estudo, auxiliou a avaliação do tempo de positividade das culturas relacionando com a quantidade bacilar a amostra. Das baciloscopias realizadas, 188 (12,37%) foram positivas, entretanto não foi possível distinguir destas amostras quais eram para diagnóstico e quais eram para acompanhamento de tratamento.

Considerando a magnitude da doença tuberculose em todo mundo, seu modo de transmissão por via aérea e a existência de tratamento, é de extrema importância a detecção precoce da infecção. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), uma pessoa

com TB contamina de 10 a 15 pessoas por ano e, por este motivo, a identificação e o início do tratamento são de extrema importância para o controle epidemiológico da enfermidade.

A metodologia manual utilizando meio de cultura sólido apresenta um tempo necessário para a positividade de amostras com presença de micobactérias maior do à automação e, por este fato, o estudo comparativo entre estes dois métodos está presente em diversos países e vem sendo realizados há alguns anos (SOMOSKOVI; MAGYAR, 1999; CHIEN *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003). Além da cultura em LJ ser uma metodologia consagrada pelo tempo e a experiência, a implantação de um método automatizado que utiliza meios líquidos, requer um investimento muitas vezes pouco viável para a instituição, diante deste motivo, faz-se tão necessária a avaliação e a comprovação das vantagens da automação quando comparado à cultura em meio sólido.

A mediana de tempo para positividade em meio em LJ foi de $31,95 \pm 15$ dias e para o meio de automação foi de $16,53 \pm 12$ dias. Os resultados encontrados estão de acordo com o estudo publicado na Espanha (SORLOZANO *et al.*, 2009), onde as amostras cultivadas em LJ positivaram em $32,4 \pm 11,9$ dias e as do método automatizado em $15,1 \pm 6,4$ dias, considerando que a quantidade de amostras avaliadas ($n=1.770$) foi semelhante a do presente trabalho. Os resultados apresentaram uma pequena variação em relação à publicação indiana, onde a automação apresentou uma média de 9,66 dias e a cultura em meio LJ, 28,81 dias (RISHI *et al.*, 2007), entretanto neste estudo foram avaliadas 500 amostras. Um trabalho egípcio encontrou uma mediana bastante próxima com $31 \pm 9,4$ dias para a metodologia manual e $18,4 \pm 14,2$ para a manual ($n=150$) (BOHY *et al.*, 2009). Apesar da diferença entre os resultados, em todos os estudos a metodologia manual necessitou de um tempo maior para a positividade de suas amostras.

Assim como a cultura, o material utilizado para a baciloscopia deve representar o órgão onde a tuberculose está em desenvolvimento. Quando foi avaliado o resultado da baciloscopia em relação ao material clínico, apenas cinco tipos de amostras apresentaram positividade: escarro, aspirado traqueal, líquido pleural, líquido brônquico-alveolar e aspirado brônquico-alveolar. O aspirado traqueal apresentou 23,5% de suas amostras positivas e o escarro, 19,9%. Estes resultados são compatíveis a uma maior presença da tuberculose pulmonar, ponderando que ambos os materiais predominantes são de origem respiratória.

Amostras extrapulmonares são, geralmente, pobres em número de bacilos (paucibacilares). Esta característica das amostras dificulta o momento da coleta, acondicionamento e transporte, assim como torna a pesquisa do bacilo, tanto na baciloscopia

quanto na cultura mais complexa (BRASIL, 2008). O LACEN recebe amostras de vários municípios do interior do Estado e, apesar das condições de armazenamento e transporte estarem sendo rigorosamente acompanhadas, o tempo decorrido entre a coleta e a realização do exame pode resultar na diminuição do número de bacilos viáveis. É plausível a suposição de que a positividade nas amostras pulmonares está relacionada com a TB pulmonar, considerando que este tipo da doença é predominante em relação às extrapulmonares. Entretanto, como não foi possível o acesso aos prontuários médicos onde eram descritas as suspeitas de diagnóstico, nem aos sintomas clínicos dos pacientes, não foi possível verificar se a doença a ser avaliada era uma tuberculose pulmonar ou extrapulmonar.

Dentre os dados avaliados, dois tipos de amostras chamam particular atenção, a urina e o lavado gástrico. Isto se deve ao fato de que em 167 amostras de urina e 100 de lavado gástrico, nenhum apresentou baciloscopia positiva. Este resultado poderia ser esperado da urina, pois apresenta uma quantidade menor de bacilos, entretanto, como é dito por trabalhos anteriores (BENTO *et al.*, 2011), o lavado gástrico apresenta um grande número de bacilos. Para contribuir com os dados fornecidos pela a baciloscopia, nenhuma cultura, em nenhuma das duas metodologias apresentou um resultado positivo para este tipo de material clínico especificamente.

Para um resultado positivo na baciloscopia em pelo menos 80% dos casos, é necessário uma quantidade de 30.000 bacilos viáveis por mL. A cultura, por outro lado, necessita de 100 bacilos por mL para apresentar crescimento (BRASIL, 2008). Em consonância com estes dados, é plausível esperar que culturas realizadas em amostras cuja baciloscopia tenha resultado negativo demorem mais para positivar que aquelas cujo resultado foi positivo.

A metodologia automatizada apresentou um tempo necessário para a positividade em amostras com a baciloscopia positiva de 10 dias, na metodologia manual este tempo foi de 21 dias. As amostras com baciloscopia negativa necessitaram de 16 dias para apresentarem uma cultura positiva na automação e 24,5 dias no método manual. O trabalho publicado no Reino Unido (CHIHOTA *et al.*, 2010), afirmou que para amostras cuja baciloscopia foi negativa, observando o número semelhantes de amostras (n=1.267), os valores foram de 14 dias para o MGIT e 25 dias para o LJ.

Em outra pesquisa (RODRIGUES *et al.*, 2009), os autores verificaram que para a baciloscopia positiva, o tempo de crescimento foi de nove dias para a automação e 38 dias para a manual, e no caso negativo, foi de 16 dias para o MGIT e 48 dias para o LJ (n=14.597).

Um experimento realizado em apenas amostras positivas para a baciloscopia (n=100), a média para o crescimento na automação foi de 4,6 dias e no LJ foi de 37 dias (HANNAN *et al.*, 2008). Foi possível visualizar que os tempos médios para o crescimento dos bacilos variou dependendo do número de amostras do experimento, considerando que a amostragem variou entre 100, 1.297 e 14.597 amostra entre os três estudos avaliados.

Foi possível, também, avaliar qual metodologia apresentou um maior rendimento em relação a detecção de amostras positivas. No presente estudo, a metodologia manual, apresentou um rendimento de 16,71%, enquanto que a automatizada, 16,97%. No estudo inglês (Chihota *et al.*, 2010), foi encontrado um rendimento de 29,7% para o MGIT e 22,8% para o LJ (n=1.267). Os resultados encontrados foram diferentes, apesar do tamanho semelhante da amostra. Neste caso, um fator que pode ter influenciado os achados é a origem do grupo de pesquisa. O atual estudo foi desenvolvido no Brasil e, apesar de ser uma pesquisa inglesa, o segundo estudo utilizou pacientes originários da África do Sul, continente com altos índices da doença.

Os espécimes que podem ser processadas para a detecção de micobactérias podem ser provenientes de cavidades fechadas, como o líquido, sendo consideradas como não contaminadas, ou apresentar microbiota associada, como o escarro, lavados, aspirados e urina. Os microrganismos contaminantes, por crescerem com maior velocidade do que as micobactérias inibem sua multiplicação. Por isso, devem ser eliminados pelo tratamento com agentes químicos, na etapa de descontaminação, aos quais as micobactérias são conhecidamente mais resistentes (WILDNER *et al.*, 2011). É versado que uma das vantagens do meio de cultura sólido é uma menor taxa de contaminação (BRASIL, 2010), isto devido ao fato do meio líquido ter uma maior quantidade de nutrientes, facilitando a proliferação das bactérias.

As metodologias manual e automatizada apresentaram diferentes níveis de contaminação. Na automação, 7,43% das amostras contaminaram e, no LJ, o resultado foi de 7,23%. Os dados encontrados foram bastante diferentes dos evidenciados anteriormente em nos estudos de CHIHOTA *et al.*, (2010), com contaminação de 16,7% para o MGIT e 9,3% para o LJ, e de SRISUWANVILAIA *et al.*, (2008), com contaminação de 12% na automação e de 10% na manual. Uma possível explicação para as baixas taxas de contaminação encontradas é fato do laboratório em estudo se tratar de uma referência a nível regional, apresentando diversos mecanismos para o controle da fase pré-analítica do processo, entre eles: treinamento dos funcionários de todos os laboratórios que enviam amostras,

disponibilização do material e das caixas térmicas para o transporte, tratamento das amostras em laboratório de biossegurança nível III e supervisão *in loco*.

A análise da relação entre contaminação e material clínico faz-se importante, principalmente na fase pré-analítica do procedimento. Diante da possibilidade de infecção pelo bacilo da tuberculose em vários sítios no organismo humano, a escolha do material é crucial para o um processamento de qualidade e, conseqüentemente, um resultado mais confiável.

Diante de informações relativas a quais materiais apresentam uma maior taxa de contaminação, é possível fazer uma escolha mais direcionada de qual material seria o mais adequado para cada tipo de manifestação da doença. Apesar da escassez de informações sobre a contaminação dos diferentes tipos de materiais clínicos para o diagnóstico da tuberculose existentes na literatura, é sabido que líquidos de cavidades estéreis, como o LCR, o líquidos cavitários, sangue e urina, quando coletados adequadamente, não devem apresentar contaminações, a exceção da urina que, por conta do tipo de coleta, é comum contaminar (BRASIL, 2010).

Dentre os materiais que deveriam ser estéreis, o LCR, o líquido ascítico e a urina, apresentaram contaminação. Como dito anteriormente, a presença de contaminantes nas amostras urinárias é prevista, quando avaliamos o modo de sua coleta. Entretanto, o LCR e o líquido ascítico não deveriam apresentar contaminação, uma vez que sua coleta é realizada por pessoal treinado, utilizando frascos estéreis (BRASIL, 2005). Este quadro pode apresentar duas possíveis explicações, ou a coleta não foi feita corretamente ou a contaminação aconteceu durante a sementeira das amostras. Como as análises foram realizadas em um Laboratório de Nível de Biossegurança III e estas amostras representam apenas 0,2% do total processado, é a plausível a explicação de que as amostras foram contaminadas durante a coleta.

O escarro representou 76,36% das amostras contaminadas na metodologia manual e 75,89% na automação. Este resultado também era aguardado, porquanto que as amostras de escarro representaram 70,53% do total de amostras analisadas. Uma maior contaminação no meio LJ era possível devido a maior manipulação durante todo o processo que envolve sementeira, incubação de até 8 semanas e leitura, nas todas as quais há contato com o manipulador, com uma diferença significativa entre os dois métodos ($p < 0,001$).

A avaliação da concordância entre as duas metodologias é de extrema importância para verificar se estas são equivalentes, ou seja, uma pode substituir a outra sem que haja prejuízo. Foi detectada uma positividade nas amostras analisadas em ambas as metodologias em 97,62% dos casos, apenas no método manual em 2,38% das amostras, e 0,52% na automação. Um total de 99,48% das amostras foi negativo nos dois métodos. Resultados diferentes foram encontrados em outro estudo (ALMEIDA *et al.*, 2005), onde ambas as metodologias positivaram em 92,5% amostras, 7,5% apenas no MGIT e 1,1% apenas no LJ. Um resultado negativo em ambos os testes foi detectado em 98,9% espécimes. É importante salientar a diferença entre as amostragens do estudo em curso (n=1.520) e da pesquisa comparada (n=844).

Um importante fator que pode ser avaliado é se a metodologia automatizada pode substituir manual, já consagrada tanto pela literatura quanto pela prática, no que diz respeito à detecção de micobactérias. A metodologia automatizada diminui não só o tempo de detecção do microrganismo, mas facilita o trabalho dos profissionais que realizam os procedimentos. Das amostras positivas, 26 espécimes (89,66%) mostraram-se como micobactérias não-tuberculosas em ambas as metodologias. Considerando apenas a automação, 10 amostras apresentaram resultado como MNT. Na cultura em LJ, 3 amostras foram identificadas como atípicas.

A medida da sensibilidade e especificidade das metodologias em relação a baciloscopia também foi avaliada. A sensibilidade mede a capacidade do teste em identificar corretamente a doença entre aqueles que a possuem, enquanto que a especificidade mede a capacidade do teste em excluir corretamente aqueles que não possuem a doença. Para um teste de diagnóstico, é de grande importância uma boa sensibilidade, pois isto pode indicar o início ou não do tratamento e a saúde ou não de um paciente.

Na pesquisa em avaliação, a sensibilidade das metodologias automatizada e manual foi de 0,87 e 0,85, e a especificidade de 0,91 e 0,91 respectivamente. Em estudos já publicados, os valores encontrados foram de 0,79 e 0,86 para a sensibilidade em LJ e MGIT, e a especificidade foi de 1,0 e 0,86, respectivamente (SORLOZANO *et al.*, 2009). A importância de uma alta sensibilidade se deve ao fato de que este parâmetro é importante para doenças graves, tratáveis e que o falso positivo não cause nenhum trauma, enquanto que uma boa especificidade é procurada em teste onde a enfermidade é de difícil tratamento e os falsos positivos podem gerar trauma. Considerando a importância da detecção precoce de uma

enfermidade que possui tratamento e que é disseminada via aérea, seria esperado que a sensibilidade dos exames fosse maior do que a especificidade, o que não ocorreu.

Quando avaliado o valor preditivo positivo (VVP), que é a proporção de indivíduos verdadeiramente positivos em relação aos diagnosticados positivos, e o valor preditivo negativo (VPN), que é a proporção de indivíduos verdadeiramente negativos em relação aos diagnósticos negativos, o estudo de SORLOZANO *et al.* (2009), apontou um VPP de 1,0 e 0,95 e um VPN de 0,98 e 0,98 para o LJ e o MGIT, respectivamente. Nesta pesquisa, os valores encontrados para VPP foram de 0,59 e 0,58 para a automação e o manual, e para o VPN, foi de 0,91 e 0,97 nos testes citados.

Os valores preditivos são relacionados a prevalência da doença em determinada localidade. Doenças com altos valores de prevalência apresentam baixos resultados no que se refere ao valor preditivo positivo e alto valor preditivo negativo. Apesar do VPN em ambos os estudos apresentarem resultados semelhantes, o VPP da pesquisa em análise foi bastante inferior ao estudo de SORLOZANO *et al.* (2009). Este achado pode ser explicado pela diferença entre as prevalências da TB em ambos os países. Em 2011, a prevalência, que é o número de casos da doença existente, da tuberculose na Espanha foi de 30 para cada 100.000 habitantes, enquanto que no Brasil foi de 91 para cada 100.000 habitantes, mais que três vezes o total.

O Brasil é um país de dimensões continentais e que, cada região, possui características social e econômica bastante diversas entre si. Apesar destas diferenças, a tuberculose atinge todo o país, não distinguindo ricos de pobres. Por ser uma doença relacionada com a saúde pública do país, o governo assume boa parte do diagnóstico e tratamento da enfermidade, auxiliando na diminuição dos casos. A substituição de uma metodologia consagrada, como o cultivo em meio sólido, para uma metodologia automatizada requer bastante estudo, considerando os altos custos relativos a treinamento e aquisição de equipamentos. Por este motivo, é importante a evidenciação de quais vantagens a automação pode trazer a saúde dos pacientes e a saúde pública do país.

7 CONCLUSÕES

A tuberculose, apesar de possuir diversos métodos precisos para a sua detecção e de apresentar um tratamento que pode evoluir a doença para a cura, continua sendo uma doença que preocupa as autoridades de diversos países, inclusive o Brasil. Considerando o fato de ser uma enfermidade que é transmitida pelo ar, os baixos níveis educacionais de grande parte da população e o ainda grande preconceito ligado ao diagnóstico da doença, as barreiras que devem ser enfrentadas para, enfim, erradicar esta doença das populações são difíceis de serem transpostas.

Foi possível demonstrar uma alta concordância entre os métodos e diversas vantagens que a metodologia automatizada apresenta em comparação a manual na rotina do laboratório. Dentre elas está a diminuição do tempo de detecção da doença, representando um grande avanço no início do tratamento dos pacientes, o que, no caso da tuberculose, pode significar a diminuição do número de casos, já que pessoas doentes deixariam de ser bacilíferas.

Alguns fatores como a diminuição da carga de trabalho dos profissionais, por a metodologia automatizada apresentar seus tubos prontos para uso e por facilitar a leitura, e os custos das duas metodologias não foram avaliados no presente estudo, entretanto são de extrema importância para a suplementação dos dados aqui apresentados e para a comprovação de que a necessidade da automação no serviço público é imperativa para a garantia de um serviço diagnóstico eficiente e de qualidade.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. Elsevier, Rio de Janeiro, 2ª ed., p.91-113. 2007.
- ANTUNES, J. L. F.; WALDMAN, E. A.; MORAES, M. A tuberculose através do século: ícones canônicos e signos do combate à enfermidade. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2. 2000.
- BANAIEE, N. E. Z.; KINCAID, U.; BUCHWALD, W. R.; JACOBS, J. R.; ERNST, J. D. Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent Mycobacterium tuberculosis is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J Immunol*, Nova York, v. 176, p. 3019-3027. 2006.
- BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med.*, Nova Inglaterra, v. 349, p. 1149-56. 2007.
- BENTO, J.; SILVA, A. S.; RODRIGUES, F.; DUARTE, R. Métodos diagnósticos em tuberculose. *Acta Med Port.*, v. 24, p. 145-154. 2011.
- BOHY, M. E.; RAAFAT, H.; ALY, F.; EL-AZIZ, M. A. Comparison between mycobacteria growth indicator tube (MGIT), BACTEC 460 TB system and lowenstein-jensen medium for detection of mycobacterium tuberculosis. *Egyptian Journal of Bronchology*, v 3, n 2, 2009
- BORGES, L. S. **Análise molecular parcial da região promotora do gene que codifica para Interleucina -10 (IL-10):** determinação de haplótipos e associação com a suscetibilidade a tuberculose. 2009. 126 f. (Mestrado em Ciências). Universidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2009.
- (a) BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília, 186p, 2011.
- (b) BRASIL. Governo do Estado do Ceará. **Informe Epidemiológico Tuberculose**. Secretaria de Saúde. Coordenadoria de Promoção e Proteção à Saúde. Núcleo de Epidemiologia. 2011
- BRASIL. Governo do Estado do Ceará. Coordenadoria de Promoção e Proteção à Saúde / Núcleo de Epidemiologia / SESA/Ce. **Boletim eletrônico epidemiologia**. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim eletrônico epidemiologia**. Brasília, Ano 10, nº 11, 2010.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 3ªed. Rio de Janeiro, 240p, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 7ª ed., 816 p, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília, 436 p., 2008.

BURNIE, D. Memórias do século XX: Marcos da medicina. **Reader'sDigest**, Rio de Janeiro, 120p, 2005.

CAMPOS, R.; PIANTA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. **Bol. da Saúde**, v. 15, n. 1. 2001.

CARVALHO, F. A. F.T. **A tuberculose através dos séculos; série histórica para a Mortalidade no município de Santos, São Paulo, Brasil, 1854-2010**. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Católica de Santos, Santos, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Basic TB Facts: Risk facts**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/risk.htm>>. Acessado em janeiro de 2012.

CHIEN, H. P.; YU, M. C.; WU, M. H.; LIN, T. P.; LUH, K. T. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 4, n. 9, p. 866–870. 2000.

CHIHOTA, V. N.; GRANT, A. D., FIELDING, K., NDIBONGO, B.; VAN ZYL, A.; MUIRHEAD, D.; CHURCHYARD, G. J. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 14, n. 8, p.1024–1031. 2010.

CONDE, M. B. et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **J. bras. pneumol**, v.35, n.10, p. 1018-1048. 2009.

DALCOMO, M. P.; NORONHA, M. K.; PICON, P. D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Rev Saúde Pública**, v. 41, Supl.1, p. 34-42. 2007.

DANIEL, T. M. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 9, p. 1181–2. 2005.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**. Elsevier. Estados Unidos da América, p. 1862–1870. 2006.

DUCATI, R. G.; NETTO, A. R.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The resumption of consumption. A review on tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

DYE, C.; WILLIAMS, B. G. The Population Dynamics and Control of Tuberculosis. **Science**, v. 328, n.5980, p. 856–861, 2010.

FERNANDES, T. M. D.; ALMEIDA, A. B. S.; NASCIMENTO, D. R. **Memória da Tuberculose**. Disponível em: <http://www.coc.fiocruz.br/tuberculose/introducao.htm>. Acessado em janeiro de 2012.

FONSECA, F. M.; SANTANA, S. C.; FONSECA, M. M.; TERRA, A. P. S.; SARMENTO, R. R.. Diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas. **R. Ci. md. biol.**, Salvador, v.10, n.1, p.77-81. 2011.

GROTZKE, J. E.; LEWINSOHN, D. M. Role of CD8+ T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbes Infect**, v. 7, p.776-88. 2005.

GUTIERREZ, M. C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R.; FABRE, M.; OMAI, S. B.; MARMIESSE, M. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog**, v. 1, p. 55-61.2005.

HANNAN, A.; CHAUDHARY, S.; SALEEM, S.; QAYYUM, A. E ARSHAD, M. U. Rapid isolation of mycobacteria—need of the hour in our settings. **J Ayub Med Coll Abbottabad**, v. 20, n. 4, p.:67-9.2008.

HIJJAR, M. A.; GERHARDT, G.; TEIXEIRA, G. M.; PROCÓPIO, M. J. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 41, Supl. 1, P50-58. 2007.

INSTITUTO CLEMENTE FERREIRA. Desafios da tuberculose diante da resistência microbiana. Secretaria de Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Rev Saúde Pública**, v. 45, p. 997-100. 2011.

JAIN, A., DIXIT, P. Multidrug resistant to extensively drug resistant tuberculosis: What is next?**Journal Biosc**, v. 33, p. 605-616. 2008.

JOHNSON, R.; STREICHER, E. M.; LOUW, G. E.; WARREWN, M.; HELDEN, P. D. V. A. N.; VICTOR; T. C. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr Issues Mol Biol**, v. 8, p. 97-112. 2006.

KANG, P. B.; AZAD, A. K.; TORRELLES, J. B.; KAUFMAN, T. M.; BEHARKA, A.; TIBESAR, E.; DESJARDIN, L. E.; SCHLESINGER, L. S. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. **J. Exp. Med**, v. 202, p. 987–90., 2005.

KAUFMANN, S. H. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **Trends Immunol**, v. 26, p. 660-7, 2005.

KEEP, N. H., J. M.; WARD, M.; COHEN-GONSAUD, B.;HENDERSON. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states.**Trends Microbiol**, v.14, p. 271-276, 2006.

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

LEE, J. J.; SUO, J.; LIN, C. B.; WANG, J. D.; LIN, T. Y.; TSAI, Y. C. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 7, n. 6, p.569–574. 2003.

LIMA, A. M.; MARTINS, E. S. J.; SOUZA, J. V. B.; SALEM, J. I. Meios de Cultivos Aplicados ao Diagnóstico Laboratorial da Tuberculose. **NewsLab**. Ed. 103. 2010.

LOPES, A. C. **Tratado de clínica médica**. 2. ed. Sao Paulo: Roca, 2006.

MARAIS, B. J.; DONALD, P. R.; GIE, R. P.; SCHAAF, H. S.; BEYERS, N. Diversity of disease in childhood pulmonary tuberculosis. **Ann Trop Paediatr**, v. 25, p. 79-86, 2005.

MARGON, S. M. C. D. **Acesso ao diagnóstico de tuberculose pulmonar no cotidiano dos trabalhadores de saúde da atenção básica**. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado da Escola de Enfermagem) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MATHEMA, B.; KUREPINA, N. E.; BIFANI, P. J.; KREISWIRTH, B. N. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. **Microbiology Reviews. J Inf Dis Clin**, v. 19, p. 658-685, 2006.

MELO, F. A. F. A experiência brasileira no controle da multidroga-resistência. **Bol. Epidemiol**, São Paulo, v. 7, n. 75. 2010.

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

NAPOLI, A. E. R.; MENDES, F. D. R.; LINO, C. M. G.; DIAS, H. C. R.; REIS, L. G. P.; REIS, L. F. A.; DIAS, A. Tuberculose urogenital: um diagnóstico desafiador. **Comun. Ciênc. saúde**; v. 22, sup. esp.1, p.11-20, 2011.

NICOD, L.P. Immunology of tuberculosis. **Swissmedwkly**, v. 137, p. 357 – 362, 2007.

NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to Tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p.599-623, 2004.

PERESI, E. **Citocinas e proteínas da fase aguda do soro como marcadores de regressão da resposta inflamatória pelo tratamento, na tuberculose pulmonar**. 2007. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

RISHI, S.; SINHA, P.; MALHOTRA, B.; PAL, N.. A comparative study for the detection of mycobacteria by bactec MGIT 960, lowenstein-jensen media and direct AFB smear examination. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 25. p. 383-386. 2007.

ROBERTS, C. A.; BUIKSTRA, J. E. The bioarchaeology of tuberculosis. A global view on a reemerging disease. **Am. J. Trop. Med. Hug.**, v. 73, n. 3, p. 649–650. 2005.

RODRIGUES, C.; SHENAI, S.; SADANI, M.; SUKHADIA, N.; JANI, M.; AJBANI, K.; SODHA, A. E MEHTA, A.. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 TB system for recovery and identification of mycobacterium tuberculosis complex in a high through put tertiary care centre. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 217-21. 2009.

SCATENA, L. M.; VILLA, T. C. S.; NETTO, A. R.; KRITSKI, A. L.; FIGUEREDO, T. M. R. M.; VENDRAMINI, S. H. F.; ASSIS, M. M. A.; MOTTA, M. C. S. Dificuldades de acesso a serviços de saúde para diagnóstico de tuberculose em municípios do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 43, n. 3, p. 389-397, 2009.

SHEPPARD, D. S. A literatura médica brasileira sobre a peste branca: 1870-1940'. **Hist Ciênc Saúde-Manguinhos**, v. 8, n. 1, p.172-92. 2001.

SILVA, J. R. L.; BOÉCHAT, N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 30, p. 478-84, 2004.

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. **Journal of clinical microbiology**. p. 1366–1369. 1999.

SOOLINGEN, D., BORGDORFF, M.W., HAAS, P.E., SEBEK, M.M., VEEN, J., DESSENS, M., KREMER, K., VAN EMBDEN, J. D. A. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. **J Infect Dis**, v. 180, p. 726-36, 1999.

SORLOZANO; ANTONIO; SORIA, I.; ROMAN, J.; HUERTAS, P.; SOTO, M. J.; PIEDROLA, G.; GUTIERREZ, J..Comparative Evaluation of Three Culture Methods for the Isolation of Mycobacteria from Clinical Samples.**J. Microbiol. Biotechnol.** v. 19, n. 10, p. 1259–1264. 2009.

SRISUWANVILAIA, L.; MONKONGDEEB, P.; PODEWILSD, L. J.; NGAMLERTA, K.; POBKEEREEREB, V.; PURIPOKAIA, P.; KANJANAMONGKOLSIRIA, P.; SUBHACHATURASA, W.; AKARASEWIB, P.; WELLS, C. D.; TAPPEROB, J. W.; VARMAB, J. K. Performance of the BACTEC MGIT 960 compared with solid media for detection of Mycobacterium in Bangkok, Thailand. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, p.402–407. 2008.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da TB: problemas e estratégias para o sucesso. **J Bras Pneumol**, v. 33, p. 323-34, 2007.

VALIM, A.R.M. **Epidemiologia molecular da tuberculose resistente a múltiplos fármacos no Rio Grande do Sul**. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

WILDNER, L. M.; NOGUEIRA, C. L.; SOUZA, B. S.; SENNA, S. G.; SILVA, R. M. E BAZZO, M. L.. Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. **Rev. patol. trop**, v. 40, n. 3, p. 207-230. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet n° 104**. Março 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>>. Acessado em janeiro de 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: WHO report 2012**. Geneva: WHO; 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO report 2008. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing**. Geneva, 2008: World Health Organization.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **TB Epidemiology and Surveillance Workshop, 2005**. Disponível em
:<http://apps.who.int/tb/surveillanceworkshop/status_analysis/risk_factors_for_tb.htm>.
Acessado em janeiro de 2012.

