

*Fabiano de Jesus Santos
Danilo Ribeiro de Oliveira
Mônica Kramer de Noronha Andrade
Dayse Figueira de Oliveira*

Manual técnico de investigação laboratorial de tuberculose

*Laboratório de Diagnóstico, Ensino e Pesquisa
Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria
Escola Nacional de Saúde Pública
Fundação Oswaldo Cruz*

2020

Fabiano de Jesus Santos
Danilo Ribeiro de Oliveira
Mônica Kramer de Noronha Andrade
Dayse Figueira de Oliveira

Manual técnico de investigação laboratorial de tuberculose

Laboratório de Diagnóstico, Ensino e Pesquisa
Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria
Escola Nacional de Saúde Pública
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, 2020

Prefácio

A realização de atividades técnicas dentro de um laboratório de investigação diagnóstica de tuberculose requer habilidades específicas dentro do campo da microbiologia e com o intuito de otimizar o dia a dia de profissionais que atuam na área, elaboramos este manual com enfoque em procedimentos técnicos em micobacteriologia de forma ilustrada, com linguagem clara e acessível. O sucesso de qualquer laboratório depende também do quanto cada profissional está preparado para executar suas tarefas diárias, e uma das razões do baixo desempenho no ambiente laboratorial é a falta de fontes seguras que abordem o passo a passo desde procedimentos mais simples aos mais complexos. Este manual, intitulado *Manual técnico de investigação laboratorial de tuberculose*, se constitui um excelente recurso didático com aplicabilidade, especialmente a profissionais que atuam em laboratório de análises clínicas e/ou especificamente em micobacteriologia. Este material serve também de guia e modelo para laboratórios de pequeno porte que desejam implantar ou implementar os procedimentos básicos que podem ser executados para análise do escarro.

Autores

Fabiano de Jesus Santos

Farmacêutico pela Universidade Gama Filho (2010), mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2020). Possui experiência em análises clínicas com ênfase em Hematologia e Micobacteriologia. Atualmente faz parte do grupo de trabalho institucional na Fiocruz para o enfrentamento de tuberculose na comunidade de Manguinhos. É também responsável pelo setor de Micobacteriologia do Laboratório de Diagnóstico, Ensino e Pesquisa do Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria da Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz.

Danilo Ribeiro de Oliveira

Farmacêutico pela Universidade Federal Fluminense (UFF - 2002), mestre e doutor em Química de Produtos Naturais pelo Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais/Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ - 2004 e 2009). Tem experiência em pesquisa e extensão nos temas: farmacognosia, etnofarmacologia, bioprospecção, atividades biológicas, legislação e educação ambiental, legislação e políticas públicas de plantas medicinais e fitoterápicos, dentre outros. Atualmente é Professor Adjunto da Faculdade de Farmácia da UFRJ e Professor Permanente dos Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/FF/UFRJ), Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Farmacêutica (CTECFAR/FF/UFRJ) e do Mestrado Profissional em Educação, Gestão e Difusão em Biociências (MP-EGeD/IBqM/UFRJ).

Mônica Kramer de Noronha Andrade

Possui graduação em Faculdade de Medicina pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (1980), mestrado em Clínica Médica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1993) e doutorado em Medicina Pneumologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2009). Médica do Ministério da Saúde, pesquisadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro e da Fundação Oswaldo Cruz. Tem experiência em projetos de pesquisa na área de Medicina e sub-áreas de doenças infectocontagiosas, saúde pública e saúde coletiva.

Dayse Figueira de Oliveira

Possui graduação em Ciências biológicas pela Universidade Gama Filho (1995). Especialista em Análises Clínicas pela Faculdade Souza Marques e Hematologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tem experiência em análises clínicas. Atualmente é responsável técnico pelo Laboratório de Diagnóstico, Ensino e Pesquisa do Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria da Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ.

Sumário

Introdução.....	7
Tuberculose.....	7
Gênero <i>Mycobacterium</i>	9
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb).....	11
Transmissão e infecção da tuberculose.....	13
Diagnóstico laboratorial de tuberculose pulmonar.....	18
Biossegurança.....	18
Coleta de escarro.....	20
Baciloscopia do escarro.....	22
Exame de baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen.....	23
Cultura de Micobactérias em amostras de escarro.....	30
Cultura de escarro pelo método de Ogawa-Kudoh.....	31
Identificação do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (cMTb).....	37
Identificação do cMTb pelo método de MPT64.....	37
Teste de suscetibilidade a fármacos.....	41
Teste de suscetibilidade pelo método de SIRE-Nitratase.....	41

Agradecimentos..... 47

Referências..... 48

Introdução

Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Apresenta-se como uma grave ameaça à saúde pública global, e apesar de ser uma doença prevenível e curável, constitui a segunda principal causa de morte entre as doenças infecciosas (PAULO et al, 2016).

O Brasil está entre os 30 países de alta carga para TB. Em 2015, o percentual de detecção de tuberculose no país, segundo a OMS, foi de 87%. Em 2019, o Ministério da Saúde divulgou o boletim epidemiológico de tuberculose no qual foram registrados 72.788 casos novos de TB em 2018. Embora, de 2009 a 2018, o coeficiente de incidência tenha apresentado queda média anual de 1,0%, entre os anos de 2017 e 2018 este indicador apresentou aumento em comparação ao período de 2014 a 2016. Em 2017, foram registrados 4.534 óbitos pela doença, o que equivale a um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/100 mil hab., sendo o mesmo valor obtido no ano anterior. Em 2018, 72,7% dos casos novos pulmonares apresentaram confirmação do diagnóstico por pelo menos um exame laboratorial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No Rio de Janeiro, em 2018, foram registrados 66,3 casos/100 mil hab., o que faz com que o Estado seja o segundo com o maior coeficiente de incidência de TB, ficando atrás somente do Estado do Amazonas que teve coeficiente de incidência de 72,9 casos/100 mil hab.

O Município do Rio de Janeiro, localizado no Estado do Rio de Janeiro, tem 6.320.446 habitantes. A cidade é subdividida em 33 regiões que abarcam 161 bairros. Apresenta desigualdades quanto ao grau de desenvolvimento, distribuição de recursos, principalmente dos serviços de saúde. O Município é dividido em dez áreas de planejamento. A AP3.1 possui cinco regiões administrativas X, XI, XX, XXIX e XXX (Ramos, Penha, Ilha do Governador, Complexo da Maré e Complexo do Alemão). Esta área é caracterizada por reunir

alto contingente de população com baixa escolaridade, baixa renda, vivendo em condições inadequadas e com baixa qualidade de vida.

A X Região abrange os bairros de Manguinhos, Bonsucesso, Olaria e Ramos. O bairro Manguinhos tem uma área territorial de 261,84 hectares e uma população com cerca de 40.000 indivíduos distribuídos em 13.220 domicílios. Trata-se de um território de grande vulnerabilidade econômica e social com um dos piores Índices de Desenvolvimento Humano (IDH) do Município do Rio de Janeiro. Em 2010, a taxa de mortalidade infantil foi muito maior do que a taxa do município, 19,6 por 1.000 nascidos vivos, o que pode ser utilizado como indicador das más condições de saúde desta população.

Em Manguinhos, a taxa de abandono de tratamento de TB em pacientes atendidos no Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria foi de 24,7% entre os anos de 2004 e 2008, elevando-se para 34% em 2010 e 2011. Estes índices são considerados muito altos quando comparados com as taxas de abandono vigente no Brasil (10%) e com a taxa aceita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (5%).

Em 2010, foi criado um convênio, entre a prefeitura do Rio de Janeiro e a Fiocruz para incremento da Estratégia de Saúde da Família, denominado Território Integrado de Atenção à Saúde (TEIAS) Manguinhos. O principal objetivo foi a cobertura de 100% do território, promovendo o cuidado pela ESF situado no Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria (CSEGSF) e na Clínica de Família Victor Valla (CFVV). No total, são duas unidades de atenção básica e uma Unidade de Pronto Atendimento (UPA) para a assistência deste território.

O Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria (CSEGSF) Pertence a Escola Nacional de Saúde Pública onde estão alocadas equipes da estratégia de saúde da família e também equipe de especialistas que pertencem a esfera federal (FIOCRUZ) tendo uma coordenação conjunta. Por participar da ENSP, o CSEGSF tem outros objetivos além da assistência tais como pesquisa e ensino. Já a Clínica da Família Victor Valla é instalada fisicamente dentro da própria comunidade de Manguinhos, e também está vinculada a ENSP. Ambos os

departamentos atuam promovendo Atenção Básica de Saúde no território de Manguinhos. Esses departamentos têm por fim a responsabilidade de ações como, a vigilância epidemiológica, a prevenção de doenças, a promoção da saúde e o atendimento da população residente no complexo de Manguinhos.

O Laboratório de Diagnóstico, Ensino e Pesquisa (LADEP) também faz parte da ENSP e dá suporte diagnóstico ao território de Manguinhos. Somente em 2016, houve a inauguração do setor de Micobacteriologia o qual foi resultante da tríade assistência-pesquisa-ensino por meio do financiamento de projetos de pesquisa. Dois pontos foram relevantes: a necessidade de um diagnóstico mais precoce da TB em um território onde esta doença é classificada como a segunda doença infecciosa mais relevante melhorando o acesso ao diagnóstico e a implantação de exames diagnósticos preconizados mundialmente como a cultura universal para micobactérias e testes de sensibilidade.

O serviço de Micobacteriologia é restrito a poucas unidades da Fiocruz e altamente especializado, assim o LADEP constitui um setor estratégico para promover a capacitação e qualificação de profissionais para execução de tarefas inerentes ao setor laboratorial.

A Micobacteriologia é o ramo da ciência laboratorial que se dedica ao isolamento e estudo do gênero *Mycobacterium* e o correlaciona às micobacterioses tuberculosas e não tuberculosas.

Gênero *Mycobacterium*

As micobactérias constitui um gênero pertencente à ordem Actinomycetales, e à família das mycobacteriaceae. São divididas em não-patogênicas (saprófitas) ou patogênicas (de importância clínica). As espécies patogênicas são subdivididas em: a) complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedii*); b) complexo *Mycobacterium avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. intracellulare*); e c) Outras micobactérias de importância clínica (*M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M.*

kansasii, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. ulcerans* e o *M. scrofulaceum*) (BRASIL, 2008; GOMES, 2013).

A parede celular da micobactéria é composta externamente por: cápsula glicolipídica, micomembrana, camada de peptídeoglicana, arabinogalactana, e, por fim, a membrana citoplasmática na região mais interna, conforme pode ser observado na figura 1 (OPLUSTIL et. al, 2004)

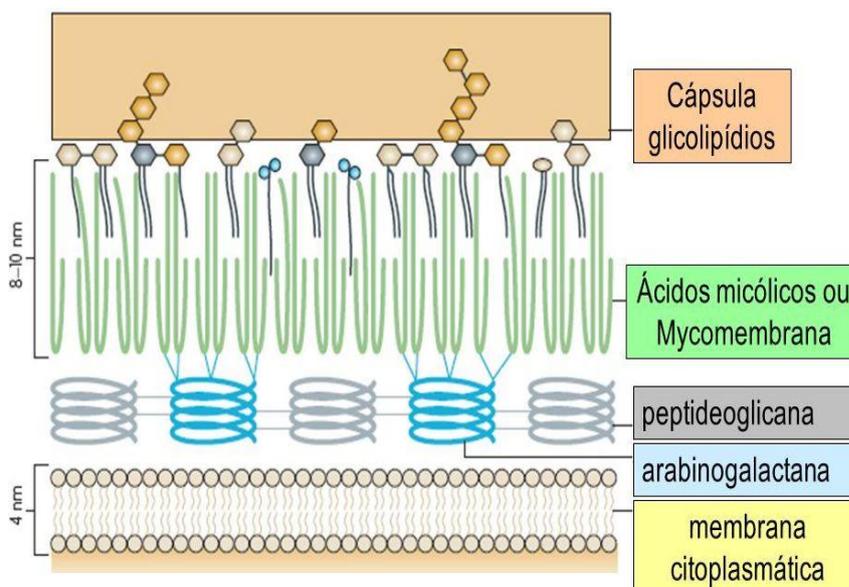


Figura 1: Estrutura bioquímica da parede celular micobacteriana. Fonte: Adaptado de OPLUSTIL et. al, 2004.

Uma das principais características das micobactéria, e que as diferenciam das demais bactérias está relacionada à quantidade de lipídeos complexos contidos na parede celular. Devido a esses altos níveis de lipídeos, e principalmente de ácidos micólicos, as micobactérias apresentam crescimento lento e resistência à descoloração por álcool e ácido. Esses lipídeos são responsáveis por 50% do peso seco micobacteriano e estão ligados de forma covalente a arabinogalactanas. Outros componentes da parede celular incluem lipoarabinomananas manosiladas (Man-LAM), lipomananas (LM) e manoglicoproteínas. A espessa camada de ácidos micólicos forma uma barreira hidrofóbica e, embora dificulte a entrada de nutrientes, confere resistência celular e a antibióticos, assim como a degradação enzimática e processos de descoloração (KLEINNIJENHUIS et al., 2011; KORKEGIAN et al., 2014).

O gênero *Mycobacterium* spp. ganhou destaque no campo da ciência por ser responsável pelo desenvolvimento de tuberculose humana, que é uma das doenças mais antigas da história, causada pela espécie *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch (BK), descrito em 1882 por Robert Koch (SOUZA, 2006).

***Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)**

Durante anos a espécie Mtb tem sido estudada quanto a virulência, dinâmica de transmissão e tratamento, principalmente, relacionado ao desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos voltados para a melhora da adesão, como também para o combate à resistência apresentada aos fármacos. De acordo com um estudo publicado na “Revista Nature”, as análises moleculares sugerem que o Mtb tenha evoluído de um ancestral comum ao *Mycobacterium canetti*, se disseminaram pelo mundo por meio das migrações humanas e evoluíram para infectar os animais (GAGNEUX, 2018).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é composto por oito espécies distintas: *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (senso estrito) que, primariamente, infecta o homem e primatas, *Mycobacterium bovis* que primariamente infecta o gado bovino e outros animais, incluindo o homem, *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin, cepa atenuada usada para a produção da vacina BCG, *Mycobacterium africanum* grupo heterogêneo responsável pela TB em humanos na África e que parece ser intermediário entre Mtb e *M. bovis*; *Mycobacterium microti* menos freqüente e que causa TB em aves e em humanos imunocomprometidos; *Mycobacterium canetti* uma variante nova de Mtb isolada, em 1969 e em 1970, de três pacientes: um deles que morava em Madagascar, outro em Papete e o terceiro, na França; mais recentemente essa micobactéria foi isolada de dois outros pacientes: um deles nascido na Somália, o outro natural da Suíça, mas que havia se contaminado na África (GOH et al, 2001), *Mycobacterium caprae* cepa isolada, inicialmente, em rebanho de cabras na Espanha; e *Mycobacterium pinnipedii* espécie nova, descoberta recentemente, patogênico para cobaias, coelhos, tapires, humanos e, possivelmente, para o gado bovino (COUSINS et al, 2003).

Mtb é uma forma de transição entre as eubactérias e os actinomicetos. É um bacilo não formador de esporos, sem flagelos, não produtor de toxina, espécie aeróbica estrita e intracelular facultativo, medindo de 1 a 4 μm de comprimento por 0,3 a 0,6 μm de largura. Seu período de geração é longo (de 16 a 20 horas) e também o de duplicação (de 18 a 48 horas), dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio (PFYFFER et al, 2003). Em estudos realizados por DAFFÉ & ETIENNE (1999), foi demonstrado que o envelope celular micobacteriano é constituído por três componentes estruturais: a membrana plasmática; a parede e a cápsula. A membrana plasmática, que é vital para a micobactéria, assemelha-se à membrana bacteriana típica e desempenha um papel pequeno no processo patológico desencadeado pela micobactéria. Esta membrana é envolvida por uma parede celular complexa, lembrando a parede das bactérias gram-positivas, diferenciando-se destas últimas pela presença da camada lipídica constituída, essencialmente, por ésteres micólicos. Esta camada lipídica, provavelmente, é responsável pela barreira de permeabilidade às moléculas polares e apresenta associações de substâncias covalentes e não covalentes ligadas ao esqueleto da parede celular. Em princípio, a micobactéria deveria ter um compartimento entre a membrana e o peptídeoglicano, análogo ao espaço periplasmático presente na bactéria gram-negativa, todavia, este espaço ainda não foi demonstrado. O outro compartimento do envelope celular é constituído por uma mistura de polissacarídeos, proteínas e lipídios que é impropriamente denominado “cápsula”, uma vez que não tem ligações não covalentes com a parede celular, ela é chamada de “cápsula” por ser a camada mais externa do envoltório celular.

A parede celular das micobactérias é constituída por um complexo de polissacarídeo co-valente de arabinogalactanas ligado à peptideoglicanas e ácidos micólicos, formando uma densa camada lipídica, de elevado peso molecular, com estrutura α -alquil e β -hidroxil responsável pela formação e uma película ao redor da micobactéria que cresce em meio líquido. Os ácidos micólicos se ramificam em longas cadeias de ácido graxo, com 60 a 90 átomos de carbono, empacotados lado a lado, perpendicularmente à superfície celular. Estes ácidos micólicos têm uma camada hidrofóbica muito pouco fluida que é uma efetiva barreira à penetração de nutrientes e antibióticos no corpo bacilar

(PARSONS et al, 1997). A alta concentração de lipídios na parede celular confere à micobactéria sua propriedade tintorial de álcool-ácido-resistência. O ácido micólico mais importante é o 6-6'dimicolato de trealose (TDM), glicopeptídeo conhecido como *fator corda*, ligado à virulência do Mtb. (CONVERSE et al, 2003; KARAKOUSIS et al, 1985; MÜLLER et al., 2018; KUHNERT et al, 2018).

No final da década de 90, o genoma das linhagens de Mtb H37Rv foi seqüenciado; seu DNA é composto por 4.411.529 pares de base; contém em torno de 4.000 genes e um conteúdo de glicina e citosina de 65%. Este genoma é rico em DNA repetitivo, particularmente em seqüências de inserção. (COLE et al, 1998). Posteriormente, novos trabalhos aperfeiçoaram o estudo do genoma de Mtb, identificando a função de inúmeras proteínas. Atualmente, é possível estabelecer a função de 2058 proteínas o que corresponde a 52% do proteoma. Cerca de 400 proteínas não mostram similaridades àquelas presentes em outros microorganismos e, deste modo, podem ser específicas de Mtb. Aproximadamente 170 genes codificam famílias de proteínas envolvidas em sua variação antigênica, enquanto cerca de 200 codificam enzimas para o metabolismo de ácidos graxos. Esta capacidade codificadora direcionada à produção de enzimas envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos parece refletir a dependência da micobactéria na degradação de lipídeos do hospedeiro, o que, em última análise, tem o objetivo de obter nutrientes e precursores de constituintes da sua parede. (COELHO et al, 2006; SOUSA, 2012; MENARDO et al, 2019)

Transmissão e infecção da tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa milenar que, permanece ainda, como uma das maiores causas de morte por doença infecciosa. É causada pelo agente etiológico conhecido como *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo álcool ácido resistente, aeróbico e de crescimento lento (WHO, 2018). A transmissão, em geral, ocorre por via aérea e é transmitida de pessoa a pessoa, pela inalação,

a partir de aerossóis emitidos através da tosse, fala ou espirro de um paciente bacilífero. Quando as partículas microscópicas, que contenham o bacilo, estão suspensas no ar ambiente, estas podem ser aspiradas, as quais podem vencer as barreiras de defesa da árvore respiratória, se depositarem nos alvéolos e iniciar o processo da doença (RATCLIFFE & WELLS, 1948; ZINK et al, 2007; LIMA et al, 2020). Na comunidade, em média, estima-se que um doente bacilífero infecte anualmente 10 a 15 pessoas. O risco de contágio para os contatos próximos é de 5% a 20% e para os contatos casuais de 0,2% a 2%. Estima-se que é necessária uma exposição de, pelo menos, 4 horas semanais para que ocorra o contágio. (KRITSKI et al, 2000). Dentre os infectados sem imunossupressão, cerca de 5% a 10% desenvolve TB, com maior ocorrência nos primeiros dois anos após o contágio (ELLNER, 1986; BLOOM, 1994). Os indivíduos infectados pelo HIV, ao serem expostos ao bacilo da TB, apresentam uma chance de 7% a 10% ao ano de desenvolver doença ativa. Assim sendo, o risco de adoecimento é 170 vezes maior para o paciente soropositivo para o HIV, na fase avançada da infecção, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e 113 vezes maior para aqueles em menor grau de imunossupressão. Nos indivíduos com outro tipo de imunodepressão, como insuficiência renal crônica, portadores de doenças malignas (câncer de cabeça e pescoço, uso de fármacos imunossupressores), o risco é de 3,6 a 16 vezes maior. Nas crianças com idade abaixo de quatro anos e nos indivíduos com idade superior a 60 anos, o risco de adoecer é cerca de 2 a 5 vezes maior do que o de um adulto jovem (JACOBS et al, 1994). Recentemente, foi publicado um aumento do número de casos de TB, no Japão, em indivíduos acima de 70 anos. Este fato foi associado ao aumento da sobrevivência dos indivíduos naquele país; a presença de co-morbidades que levam a um maior número de complicações clínicas e que contribuem com a demora no diagnóstico causando o aumento da morbi-mortalidade por TB. (YAMAGISHI, 2004).

Quanto ao gênero, o acometimento da TB é maior no sexo masculino do que no feminino embora, nos últimos anos, devido o aumento do número de casos de HIV/AIDS em mulheres, e, a presença de co-infecção TB/HIV associada, observa-se uma mudança neste padrão. Em um estudo feito no município do Rio de Janeiro, com o objetivo de descrever diferenças do comportamento da TB em ambos os sexos, por meio do levantamento de 55.258

notificações de casos de TB, num período de 5 anos, observou-se que a informação sobre história de contato recente com indivíduo com TB e a positividade ao teste tuberculínico foi maior no grupo do sexo feminino. Quanto à faixa etária, a distribuição encontrada foi diferente entre ambos os grupos: da puberdade a 34 anos, o risco relativo foi maior no sexo feminino; e, após, até chegar a idade avançada, maior no sexo masculino quando então, os dois grupos tendem a se aproximar. Alguns trabalhos sugerem, que em países com alta prevalência de TB, as mulheres na fase reprodutiva, uma vez infectadas por *M.tb* evoluem mais rapidamente para doença do que os homens com a mesma faixa etária e, ao se comparar dentro do grupo do sexo feminino, aquelas em fase puerperal apresentam maior risco para o desenvolvimento de doença. (TINDÓ et al, 2004; HOLMES et al, 1998)

Estudos apontam surtos de tuberculose (TB) em ambientes fechados sem ventilação apropriada, como hospitais, prisões e albergues. Hospitais que atendem pacientes com TB pulmonar apresentam elevado risco para os profissionais de saúde. A ventilação local é, portanto, fundamental na prevenção da transmissão do bacilo da TB, assim sendo, as medidas de biossegurança são consideradas estratégicas em tais ambientes (COSTA et al, 2004; MUZY DE SOUZA et al, 2002; KRITSKI & RUFFINO 2000; VALWAY et al, 1994; SILVA et al, 2004).

A TB pode se desenvolver por uma sequência de eventos com duas possibilidades: infecção ou doença. Em primeiro momento, os bacilos podem ser eliminados através da reação imunológica inata. Senão, dentre os indivíduos infectados, alguns podem desenvolver a tuberculose ativa e outros podem desenvolver a tuberculose latente. Estima-se que, um terço da população mundial possui infecção latente de tuberculose (ILTB) (CEZAR, 2012; JUNIOR et al, 2019).

Após a inalação, os bacilos contidos nas partículas são reconhecidos e fagocitados por macrófagos presentes nos alvéolos pulmonares, ocorrendo intensa proliferação e desenvolvimento da resposta imune celular com a participação de linfócitos T CD4⁺ e, em seguida, linfócitos T CD8⁺. Posteriormente ocorre a participação de células dendríticas e macrófagos derivados de monócitos (MOUTINHO, 2011; PAI et al, 2016).

No momento em que ocorre a fagocitose do Mtb, tanto os macrófagos quanto as células dendríticas iniciam a produção de interleucina 12 (IL-12), por meio de receptores *Toll Like Receptor* (TLR). Os linfócitos T CD4⁺ produzem interferon gama (IFN- γ) que, por sua vez, ativam macrófagos infectados induzindo a produção de oxigênio e nitrogênio reativos, fundamental para eliminação do Mtb. É importante ressaltar que o IFN- γ produzido por linfócito T CD8⁺ ativa a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelos macrófagos. Esses eventos contribuem para o desenvolvimento de granuloma (SOUSA, 2006; MASSABNI et al, 2019).

O granuloma é definido como uma massa de células, contendo macrófagos ativados, células epiteliais e polimorfonucleares, delimitada por linfócitos e que, tardiamente é envolta por um tecido fibrótico. O principal papel desempenhado pelo granuloma é o confinamento dos bacilos no interior dos macrófagos e a indução da expressão da óxido nítrico sintase que, previne a disseminação e concentra a resposta imunológica no local da infecção. Neste estágio, a viabilidade do bacilo é mantida, mas no estado não replicativo, pois o granuloma estabelece a privação de nutrientes e oxigênio no local, assim sendo, portanto, o hospedeiro está somente infectado e não com a doença. Nesta ocasião, os bacilos podem persistir, formar a base da lesão tuberculosa e perdurar por anos (FILHO et al, 2001; BARBERIS et al, 2017; SANTOS, 2017).

Entretanto, se houver ineficiência do sistema imune do hospedeiro, o centro do granuloma evolui para um processo de necrose caseosa e liberação de bacilos, ao qual inicia-se um novo ciclo de transmissão. Em geral, ocorre infecção pulmonar, porém as micobactérias podem migrar e atingir outros órgãos por via hematogênica, quando isso ocorre a infecção é definida como extrapulmonar (OLIVA et al, 2019).

A tuberculose extrapulmonar é uma manifestação da doença sistêmica podendo atingir vários órgãos e sistemas, sendo responsável por quadros clínicos variados. O diagnóstico destas formas pode ser dificultado por várias razões, entre as quais a pobreza de bacilos, que, sabidamente, acompanha estes quadros. Outra dificuldade refere-se ao diagnóstico histopatológico, já que a ausência de granulomas em tecidos não exclui a possibilidade da doença.

Assim, a análise criteriosa de métodos de imagem associada a alto grau de suspeição, dentro de um contexto clínico-epidemiológico, pode ser decisiva na definição dos casos. As formas mais frequentes da tuberculose extrapulmonar incluem o pleural, linfonodal, o urogenital e o meningoencefálico. A TB extrapulmonar é considerada preocupante, uma vez que, a mesma pode desenvolver quadros mais graves quando atingem o sistema nervoso central. Entretanto, muitas vezes, nessas formas, a baciloscopia é negativa, e não contribuem para a disseminação da doença (CAPONE et al, 2006; GARCIA et al, 2011; BETHLEM, 2012; OLIVA et al, 2019;)

Diagnóstico laboratorial de tuberculose pulmonar

Todos os casos de tuberculose pulmonar devem ser diagnosticados por meio de confirmação bacteriológica laboratorial. Esta pesquisa bacteriológica é fundamental tanto para o diagnóstico quanto para o acompanhamento e controle de tratamento da tuberculose (TB). O diagnóstico laboratorial de tuberculose pulmonar consiste na análise, principalmente, do escarro através da realização de baciloscopia, também chamada de pesquisa de BAAR (Bacilo Álcool Ácido Resistente), cultivo microbiológico, identificação de espécie e teste de suscetibilidade a fármacos. Resultados bacteriológicos positivos confirmam a tuberculose ativa em pacientes que apresentam quadro clínico sugestivo de TB e em sintomáticos respiratórios (BRASIL, 2008; BRASIL, 2019).

Biossegurança

A biossegurança tem por finalidade minimizar a exposição dos funcionários e do meio ambiente aos agentes infecciosos através de condições de segurança na utilização conjunta de equipamentos de proteção, práticas e procedimentos laboratoriais na instituição.

Pela classificação de agentes etiológicos baseada no grau de risco, a espécie *Mtb* e outros microrganismos capazes de infectar através de aerossóis, são considerados como grupo de risco 3. O risco para profissionais de laboratórios que manipula diretamente o bacilo é de 3 a 5 vezes maior que em outras pessoas (BRASIL, 2019).

As medidas de biossegurança no laboratório de micobacteriologia podem variar conforme a complexidade dos exames realizados, podendo ser nível II (para procedimentos que não gerem aerossóis) e nível III (quando há possibilidade de aerossóis) (CUNHA, 2014).

Para a redução da formação de aerossóis pelos procedimentos laboratoriais e sua dispersão, diversas medidas técnicas são adotadas. São elas:

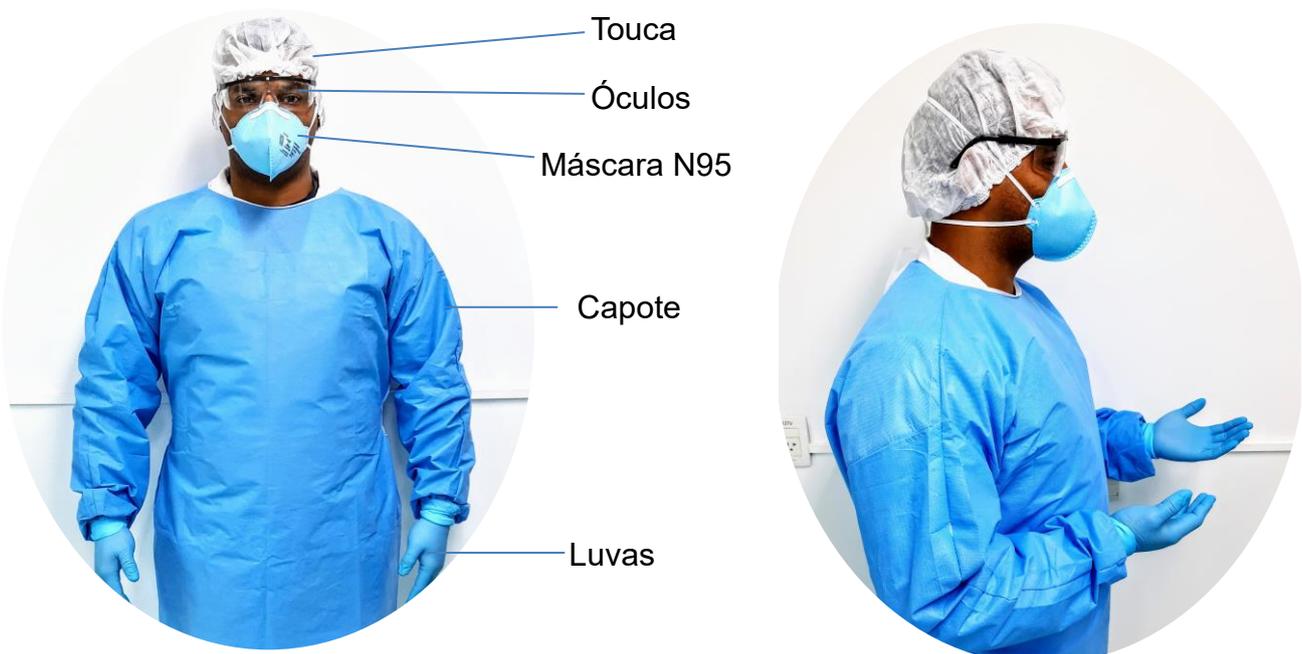
barreira de contenção primária, que engloba boas práticas microbiológicas, cabines de segurança biológica classe II B2, centrífugas com caçapa de segurança, luvas, máscara N95 e aventais; e barreira de contenção secundária, que consiste na separação do laboratório de micobactérias dos demais laboratórios e com restrição de acesso (GALDINO, 2015).

Cabine de segurança biológica classe II B2



A cabine de segurança biológica (CSB) é um dos principais dispositivos de contenção primária contra agentes infecciosos e aerossóis gerados durante o procedimento. Existem três tipos de CSB, são elas, classe I, II e III, e subdivididas em A, B1 e B2. Para a manipulação de material biológico com *M. tuberculosis*, recomenda-se a utilização da CSB classe II B2, pois esta, além de não ocorrer recirculação de ar no interior do equipamento, protege o ambiente, operador e o material exposto na área de trabalho no interior da CSB.

Equipamento de proteção individual (EPI)



Coleta de escarro

O escarro é a amostra clínica de origem pulmonar mais utilizada para o isolamento de micobactérias, principalmente para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, pois apresenta-se como o material com maior quantidade de bacilos e de fácil obtenção. A amostra de escarro mais adequada é a proveniente da árvore brônquica, por expectoração espontânea. O volume ideal é de 5 a 10 mL. Embora a árvore brônquica seja estéril, a expectoração contamina-se ao passar pelo trato respiratório superior, o escarro é, portanto, contaminado.

O escarro deve ser coletado em pote de plástico transparente, de boca larga e com tampa de rosca. Após a coleta o material pode ser conservado em refrigeração com temperatura entre 2 e 8°C por 5 a 7 dias, sem que se perca a viabilidade para a cultura e exame de baciloscopia.

As recomendações para coleta de escarro devem ser adaptadas por cada unidade de saúde. No caso do Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria da ENSP/FIOCRUZ, foram padronizadas as seguintes recomendações a serem dadas aos pacientes:

ESCARRO ESPONTÂNEO COLETADO NO MESMO DIA DA CONSULTA - 1ª AMOSTRA

- 1) Vá ao banheiro, lave as mãos com água e sabão e a boca apenas com água.
- 2) Passe na recepção do Centro de Saúde e com os 2 pedidos de exame, pegue os 2 potes coletores.
- 3) Vá até o **ESCARRÓDROMO** seguindo a sinalização. Você verá, do lado de fora, à esquerda, uma área com toldo azul, plantas e um banco para apoiar os seus pertences.



- 4) Ao chegar ao local, encha bem os pulmões respirando bem fundo.
- 5) Segure o ar nos pulmões por instantes. Ao jogar o ar para fora **TUSSA** escarrando em **apenas um dos potes**, sem encostar os lábios na borda ou tocar a parte interna do pote com os dedos.



- 6) Feche bem o pote coletor e o coloque dentro do saco plástico.

ESCARRO ESPONTÂNEO COLETADO EM CASA – 2ª AMOSTRA

- 1) Procure tomar a maior quantidade de água possível durante a noite da véspera do exame.
- 2) Ao acordar, lavar as mãos com sabão e a boca apenas com água para retirar qualquer resto de alimento ou medicamento. Lavar a prótese, caso use.
- 3) Procure o local da sua casa mais ventilado possível e faça como na figura abaixo:



- 4) Feche bem o pote coletor, coloque dentro do saco plástico e entregue no laboratório em 2 horas. Caso você não possa entregar, peça a algum familiar ou pessoa de confiança que entregue por você trazendo a documentação.

Baciloscopia do escarro

Também chamado de exame microscópico direto, a baciloscopia consiste na observação e contagem de bacilos presentes na amostra. O exame realizado no escarro permite saber se o indivíduo está no período de infecciosidade, ou seja, se está expelindo bacilos com potencial transmissão a outros indivíduos. É um método simples e seguro, em geral, realizado por laboratórios públicos de saúde e laboratórios privados tecnicamente habilitados (CUNHA, 2018).

O método de Ziehl-Nielsen é o mais utilizado para a pesquisa do bacilo álcool ácido resistente (BAAR) em amostras de escarro. É indicado nas seguintes condições: a) Sintomáticos respiratórios (SR); b) suspeita clínica e/ou radiológica de TB pulmonar, independentemente de tosse; e c) acompanhamento e controle de tratamento/cura. Para o diagnóstico, o exame deve ser realizado em duas amostras consecutivas, a primeira na ocasião da consulta médica inicial, e a segunda no dia seguinte, preferencialmente ao despertar. Amostras adicionais podem ser solicitadas em casos de primeira e segunda amostras negativas, mas com indícios radiológicos e clinicamente sugestivos para TB. Para o acompanhamento e controle de tratamento deve ser realizado uma baciloscopia para cada mês de tratamento (BRASIL, 2008).

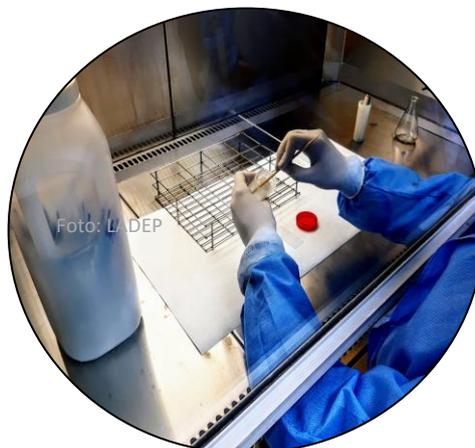
A pesquisa de BAAR no escarro, quando realizada corretamente, possibilita a detecção de 60 a 80% dos casos de TB pulmonar. Sobre o aspecto

epidemiológico, destaca-se como de fundamental importância, tendo em vista que, pacientes com baciloscopia positiva são os principais responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão. Entretanto, apesar de um resultado positivo confirmar a infecção, um resultado negativo não descarta a possibilidade de o indivíduo estar com a infecção, pois alguns indivíduos podem estar na fase latente da doença ou apresentar-se como paucibacilares, quando o número de bacilos expelidos é baixo e impossibilita sua identificação em lâmina. O diagnóstico de certeza da doença somente é obtido a partir da realização da cultura bacteriológica (BRASIL, 2019).

Exame de baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen

A) Confeção do esfregaço

1. Preparar a cabine de segurança biológica (CSB), separar e fazer a assepsia com álcool 70% de todo o material que será utilizado antes de introduzi-lo na CSB;
2. Forrar com papel absorvente a área da cabine onde será realizado o procedimento e após colocar todos os instrumentos, a serem utilizados no procedimento, no interior da cabine, ligar a luz UV por 30 min;
3. Separar uma amostra por vez para confecção do esfregaço;
4. Identificar a lâmina com lápis grafite na parte fosca, escrevendo o número de registro e as iniciais do paciente;
5. Abrir o frasco contendo a amostra de escarro delicadamente e colocar a tampa voltada para cima;



6. Quebrar o palito de madeira e com a parte farpada pegar a parte mais purulenta da amostra e depositar na lâmina perto da parte fosca. Distender na posição horizontal, fazendo movimentos de vai e vem até obter um esfregaço homogêneo em 2/3 na lâmina;



7. Descartar o palito no recipiente rígido para ser autoclavado;
8. Fechar bem o frasco da amostra;
9. Deixar o esfregaço secar em temperatura ambiente dentro da cabine.

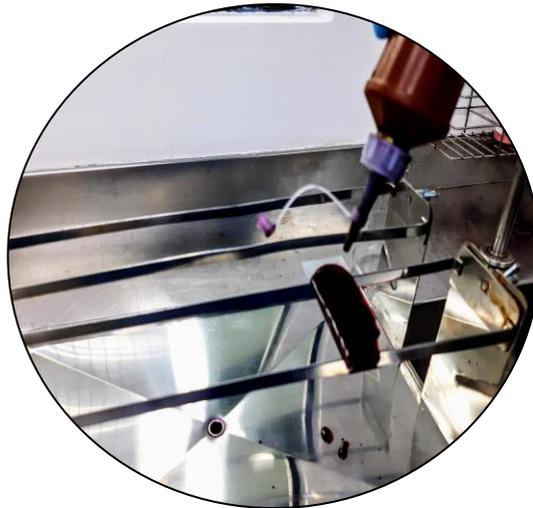
B) Fixação do esfregaço

1. Antes de iniciar a coloração, posicionar as lâminas na grade de coloração disponível na pia do setor, acender uma chama e passar o fogo na parte inferior da lâmina por três vezes rapidamente;
2. Seguir com a coloração

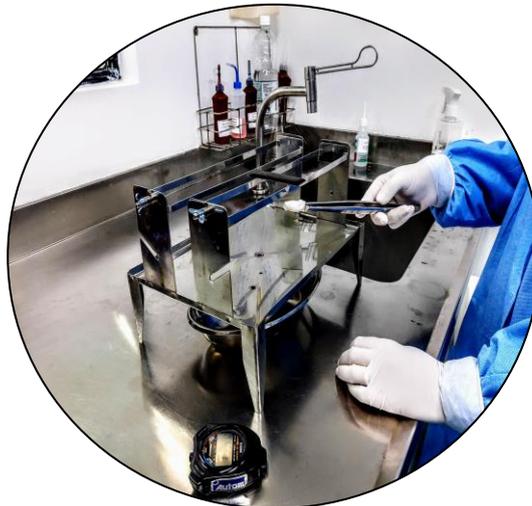
C) Coloração do esfregaço

1. Colocar as lâminas com os esfregaços preparados no suporte para coloração;

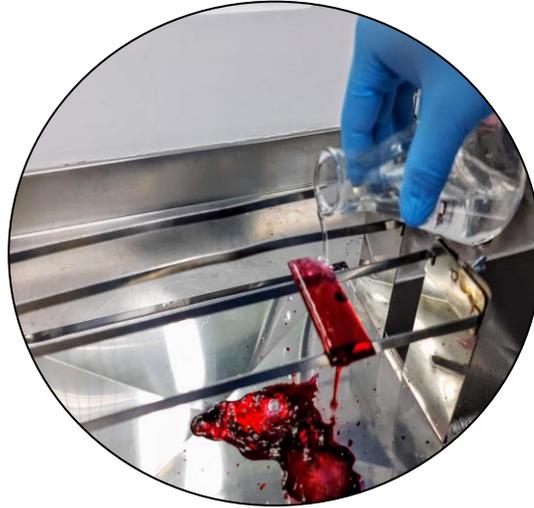
2. Cobrir todo o esfregaço com o corante de Fucsina Ziehl-Neelsen;



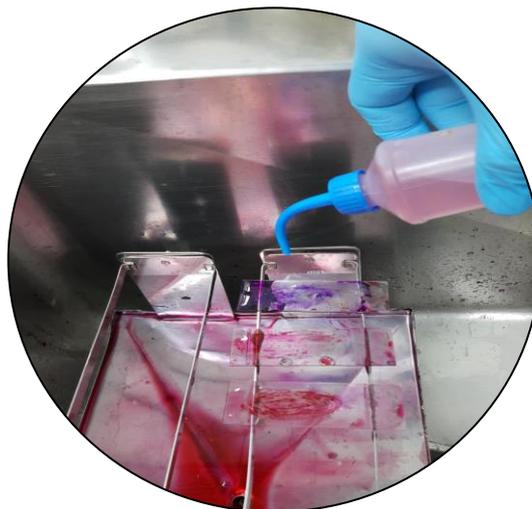
3. Umedecer a gaze enrolada numa haste grande de metal com álcool e acender uma chama com um isqueiro;
4. Passar a chama, lentamente, debaixo da lâmina até que ocorra a emissão de vapores visíveis, marcar 5 minutos e repetir esse procedimento por mais duas vezes dentro deste intervalo de 5 minutos;



5. Desprezar o excesso de fucsina, inclinando a lâmina na cuba da pia, e escorrer o restante do corante com um filete de água, suavemente para não desprender o esfregaço;

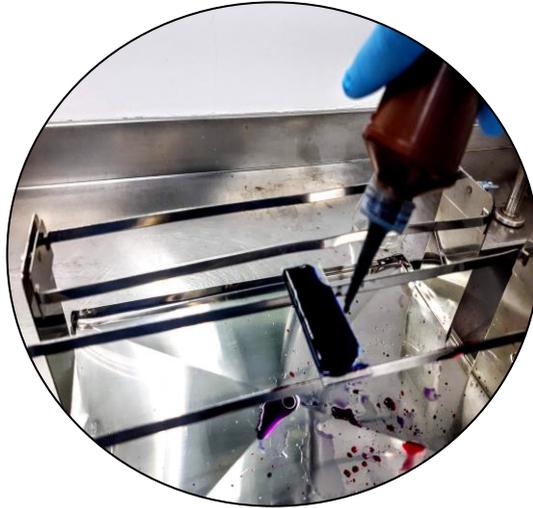


6. Cobrir a lâmina com a solução descorante álcool-ácida por 1 minuto;

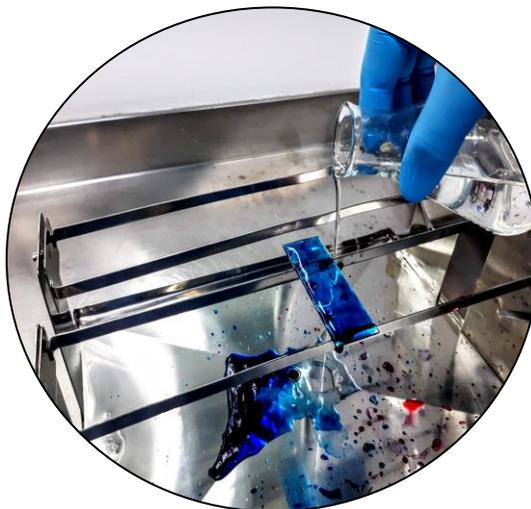


7. Desprezar o excesso de solução álcool-ácida inclinando a lâmina e escorrer o restante da solução álcool-ácida por um filete suave de água;

- Cobrir o esfregaço com azul de metileno (corante de fundo) por 30 segundos;

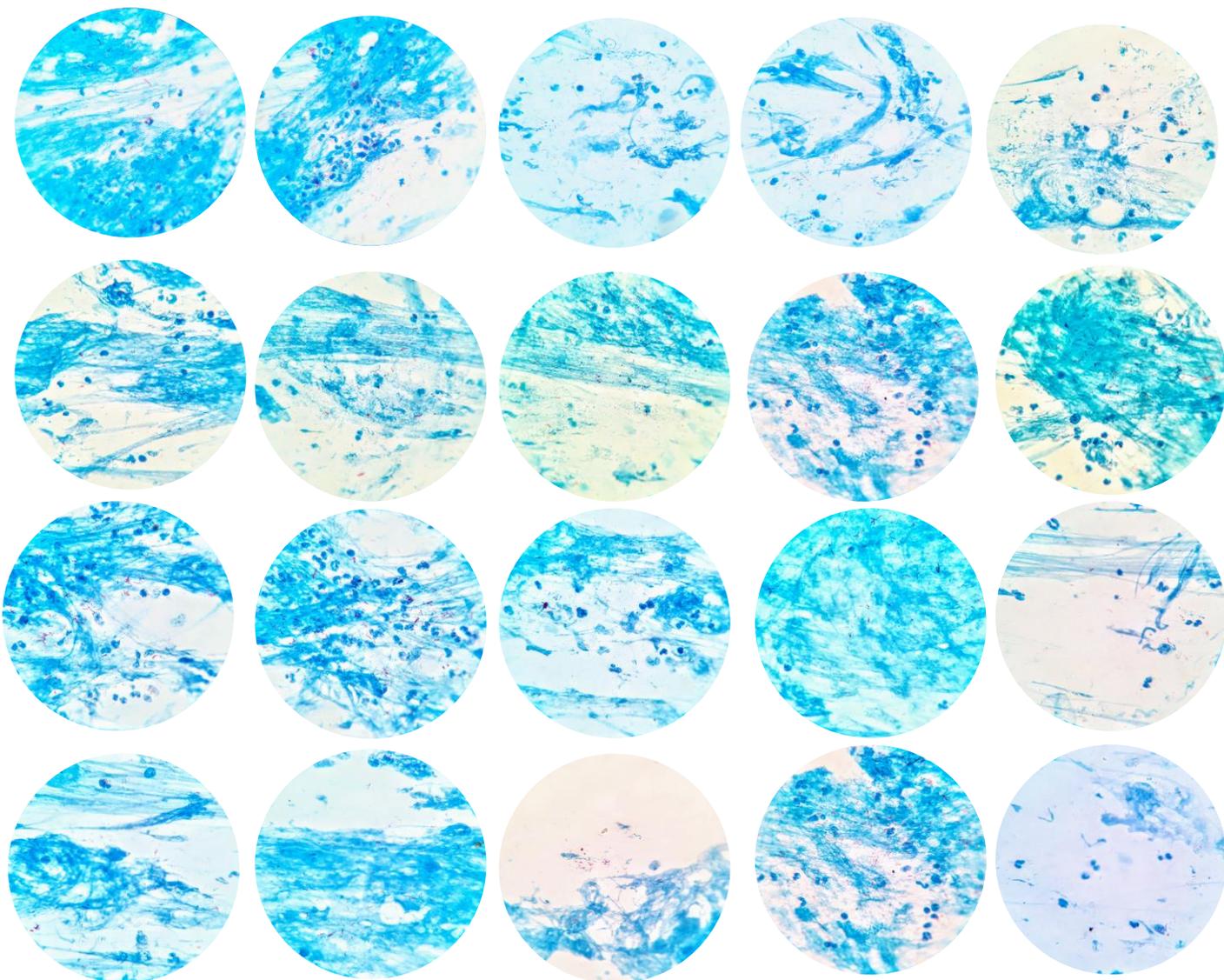


- Desprezar o excesso de azul de metileno inclinando a lâmina, lavar o esfregaço com água corrente e deixar secar no suporte para lâminas em temperatura ambiente.



10. Ao término da leitura dos 100 campos, somar os bacilos encontrados;
11. Analisar o resultado em 100 campos: 10 – 99 bacilos = Positiva (+), 1 – 9 bacilos = Relatar a quantidade encontrada. 0 (zero) bacilos = Negativa;
12. Se a amostra for negativa em 100 campos observados, proceder com a leitura até completar 200 campos para liberação do resultado final.

Exemplo 1:



Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Campo 6	Campo 7	Campo 8	Campo 9	Campo 10
27	66	19	16	21	32	62	48	64	39
Campo 11	Campo 12	Campo 13	Campo 14	Campo 15	Campo 16	Campo 17	Campo 18	Campo 19	Campo 20
68	59	18	22	8	11	22	21	62	6
Total de Bacilos encontrados = 691									
Média = $691/20 = 35$ bacilos (média > 10, então o resultado dessa leitura é Positivo +++)									

Cultura de Micobactérias em amostras de escarro

Por aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico de tuberculose nos casos pulmonares com baciloscopia negativa e apresentar elevada especificidade e sensibilidade, a cultura é considerada o método padrão ouro para investigação de tuberculose (BRASIL, 2008; CEZAR, 2012; BRASIL, 2019)

A cultura micobacteriana consiste em submeter o escarro a um substrato (meio de cultura sólidos ou líquidos) e atmosfera favorável ao crescimento bacteriano. O gênero *Mycobacterium* é extremamente exigente para desenvolvimento *in vitro*, possui metabolismo lento que resulta em um tempo maior para o surgimento de colônias visíveis quando comparada a outras bactérias, por isso são chamadas também de bactérias fastidiosas (OPLUSTIL et. al, 2004; GOMES, 2013).

Os meios de cultura comumente utilizados são os meios sólidos conhecidos como Lovestein-Jensen e Ogawa-Kudoh, ambos com composição a base de ovos. Esses meios possuem vantagem por apresentarem menor custo e baixo índice de contaminação. Porém devido ao tempo relativamente alto de detecção, que varia de 14 a 30 dias, ou até 8 semanas, faz com que os meios sólidos apresentem desvantagem quando comparado com os meios líquidos em relação ao tempo para obtenção do resultado. Os meios líquidos como do MGIT (sistema de detecção de micobactérias), por exemplo, são utilizados em metodologias automatizadas e o tempo de resultado pode variar entre 5 a 12 dias se a amostra for positiva, e 42 dias quando a amostra for negativa. No entanto, os métodos automatizados, por serem muito dispendiosos, fazem com que a maioria dos laboratórios utilize os métodos com meios sólidos para o cultivo de micobactérias. O método de Ogawa-Kudoh tem sido o mais utilizado, principalmente pelos laboratórios de pequeno porte (COELHO, 1999; MALACARNE, 2019).

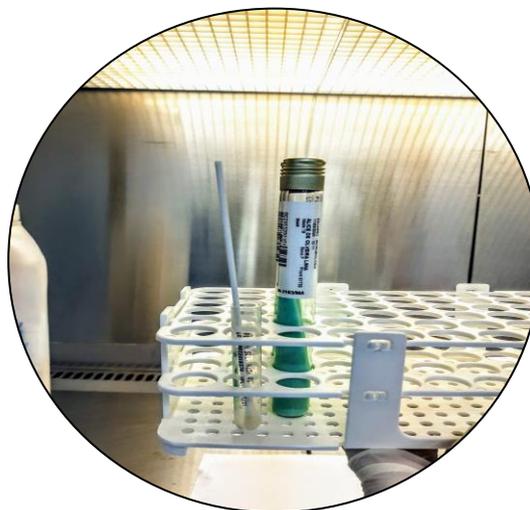
O cultivo de micobactérias pelo método Ogawa-Kudoh consiste em um procedimento simples, que além de ser de baixo custo, apresenta menor risco para os profissionais que executam a técnica, sobre o ponto de vista da biossegurança, tendo em vista que não utiliza centrifugação, o que reduz a

intensidade de dispersão de partículas contaminadas no ambiente laboratorial (BRASIL, 2019).

Cultura do escarro pelo método de Ogawa-Kudoh

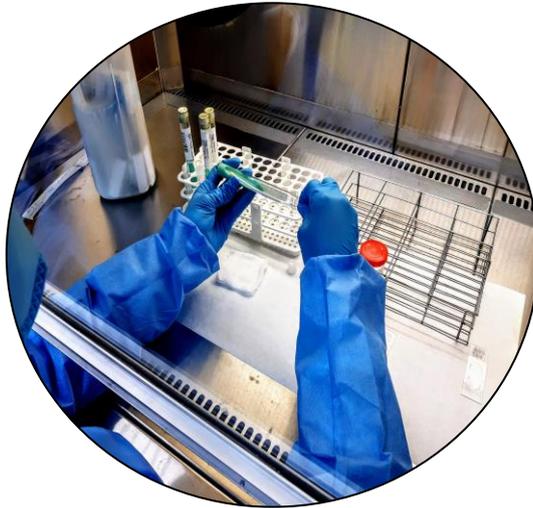
A) Cultivo

1. Preparar a cabine de segurança biológica, separar e fazer a assepsia com álcool 70% de todo o material que será utilizado antes de introduzi-lo na CSB;
2. Forrar com papel absorvente a área da cabine onde será realizado o procedimento;
3. Semear cada amostra em dois tubos de meio cultura Ogawa-Kudoh a temperatura ambiente;
4. Dentro da CSB, abrir o frasco contendo a amostra de escarro delicadamente e colocar a tampa voltada para cima;
5. Com um swab estéril, pegar a parte mais purulenta da amostra e transferir para um tubo com 3 mL de NaOH a 4% sem deixar que o swab toque na parede do tubo;

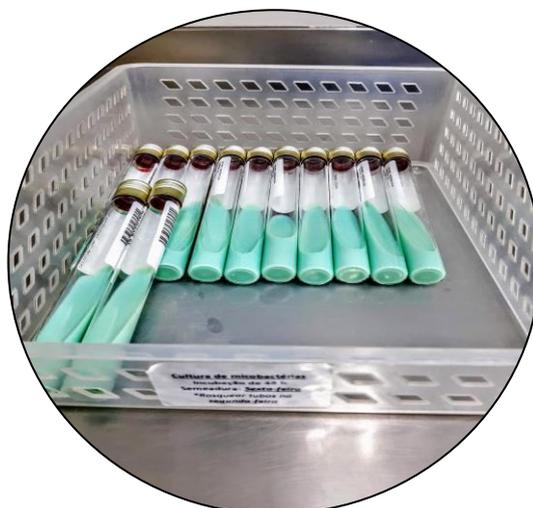


6. Cronometrar por 2 minutos;
7. Retirar o swab pressionando-o contra a parede do tubo de vidro para escorrer o excesso de NaOH;
8. Abrir o tubo contendo o meio de cultura OK e identificada com os dados do paciente;
9. Desprezar a água de condensação, se houver, em uma gaze estéril;

10. Levar o swab com a amostra até superfície do meio de cultura sem tocar na boca e nas paredes do tubo;
11. Tocar o swab no meio de cultura e pressionando levemente, fazer estrias em zigue-zague e com movimentos rotatórios até o início do meio;



12. Fechar o tubo e repetir o processo com o outro tubo de meio de cultura OK;
13. Desprezar o swab em recipiente rígido para autoclavagem, realizar a limpeza e descontaminação da cabine de segurança biológica;
14. Deixar os tubos semeados entreabertos e inclinados por 48h, numa bandeja de polipropileno com furos e em estufa bacteriológica a $36,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;



15. Após as 48h, realizar a leitura, fechar os tubos completamente e passar para posição horizontal e aguardar por até 8 semanas ou até posituação.

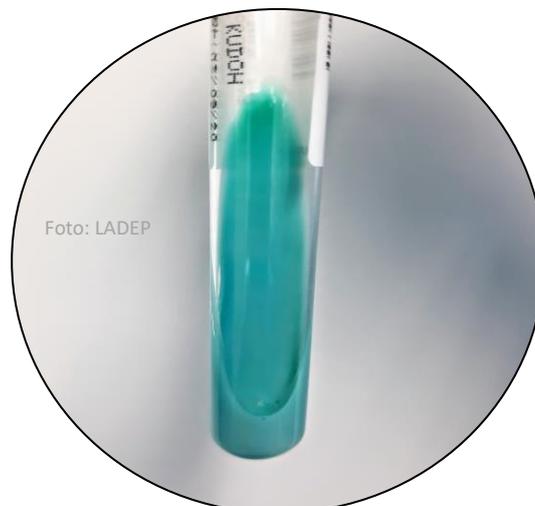


B) Leitura dos cultivos

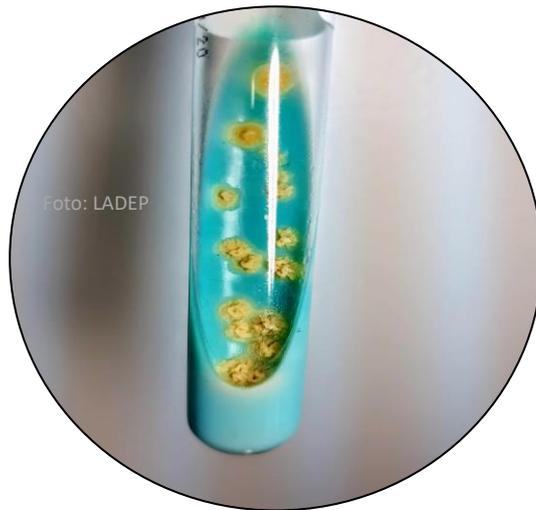
⇒ A leitura deverá ser realizada em 48h, 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 7^a e 8^a semana.

C) Resultados possíveis:

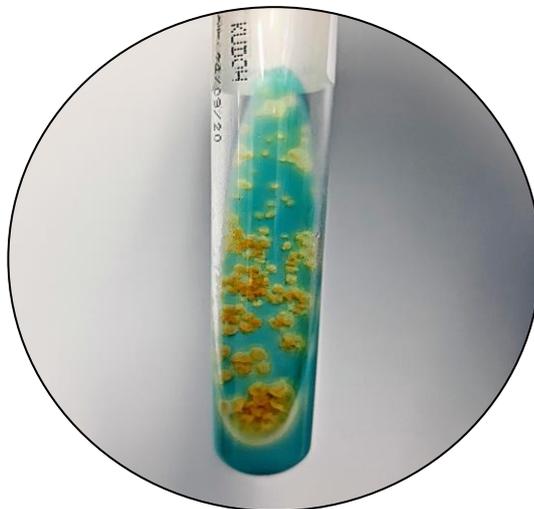
1. Negativa = Ausência de colônias após 8 semanas de incubação;



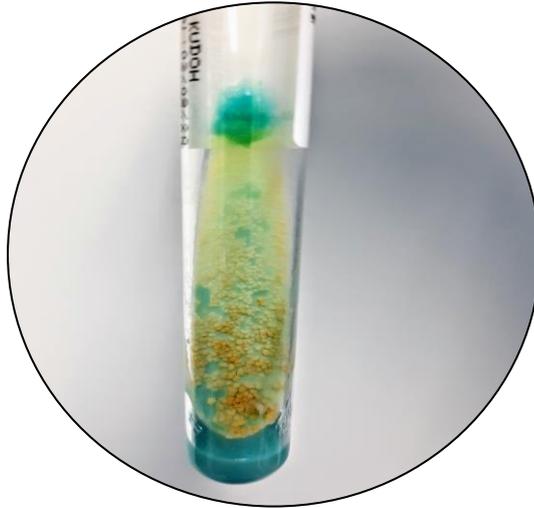
2. Positiva = Presença de menos de 20 colônias visíveis;



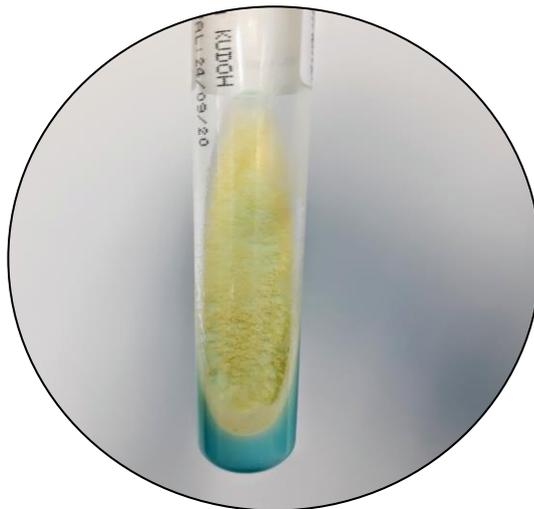
3. Positiva (+) = Presença de 20-100 colônias;



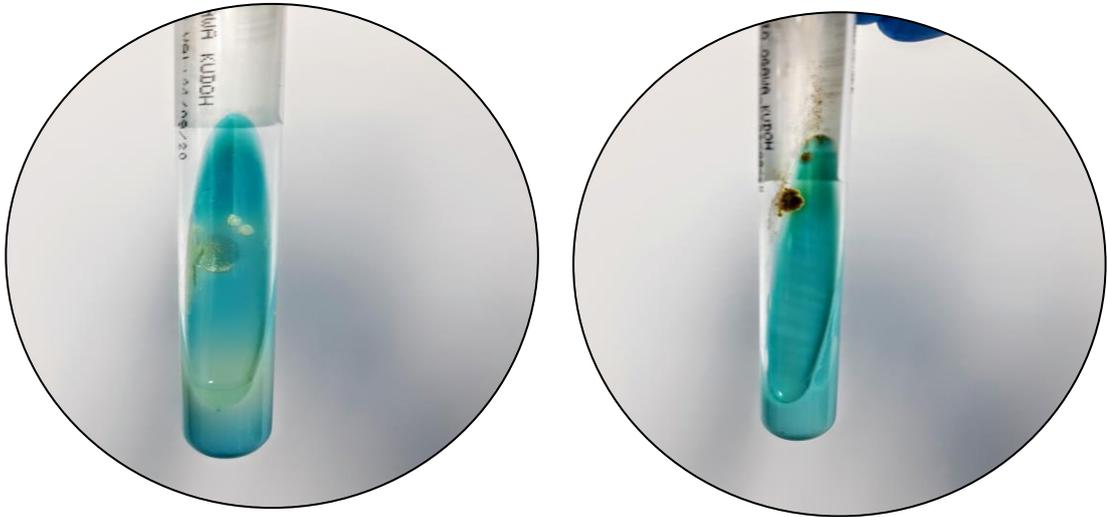
4. Positiva (++) = Presença de mais de 100 colônias;



5. Positiva (+++) = Presença de colônias confluentes (“tapete”);



6. Exemplos de contaminação



7. Após visualização de qualquer tipo de crescimento, é necessário confeccionar um esfregaço diretamente da colônia e realizar a coloração de Ziehl –Neelsen para confirmar a presença de BAAR;
8. Após a posituação das amostras, proceder com a identificação da micobactéria e com a realização do teste de sensibilidade a antibióticos.

Observação 1: Após a realização desses testes, os meios deverão ser desprezados em recipiente rígido para material perfurocortante e autoclavado. Amostras negativas só poderão ser desprezadas após 8 semanas completas de incubação.

Observação 2: As amostras contaminadas com mudança de coloração ou liquefação do meio de cultivo devem ser descartadas assim que identificadas. Antes disso, registrar a informação e se não houver mais tubos desse paciente, solicitar uma nova amostra.

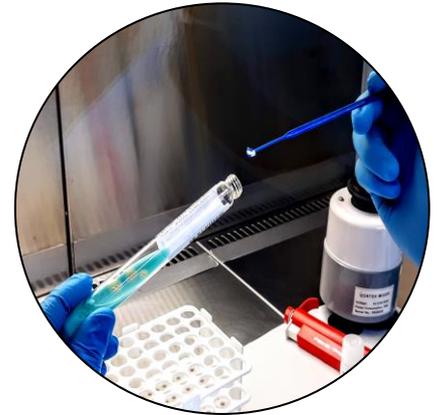
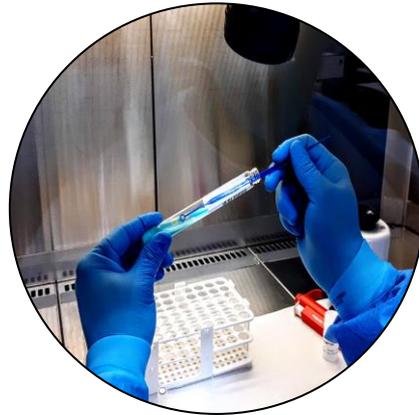
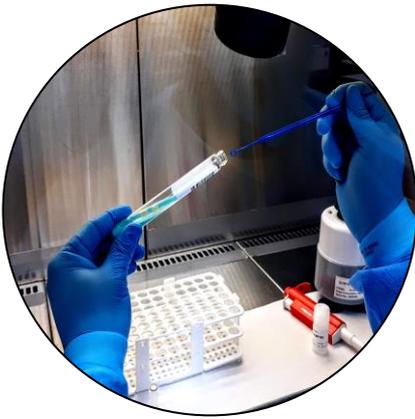
Identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (cMTb)

Para saber se a cepa isolada em cultura pertence ao *cMtb* ou ao grupo de micobactérias não tuberculosas, a mesma precisa passar por métodos laboratoriais de diferenciação. A identificação pode ser feita por métodos bioquímicos e fenotípicos ou por meio de técnicas moleculares. Entretanto, os métodos convencionais, por serem trabalhosos, demorados, e principalmente, muito dispendiosos, estão sendo substituídos pelo teste rápido conhecido como *TB Ag MPT64*, na maioria dos laboratórios de micobacteriologia. Uma metodologia de simples execução, de baixo custo, e que apresenta alta sensibilidade e especificidade. Sabe-se que as micobactérias secretam mais de 33 proteínas diferentes. Uma das proteínas predominantes, a MPT64 foi encontrada somente em culturas do complexo *MTb* e diante disto, foi desenvolvido o teste para identificar especificamente esta proteína (ABE et al, 1999).

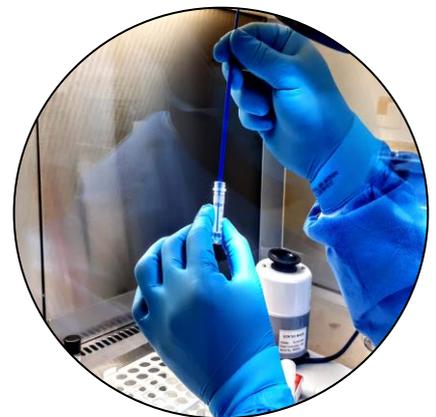
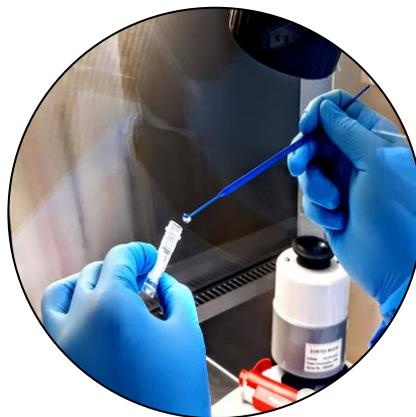
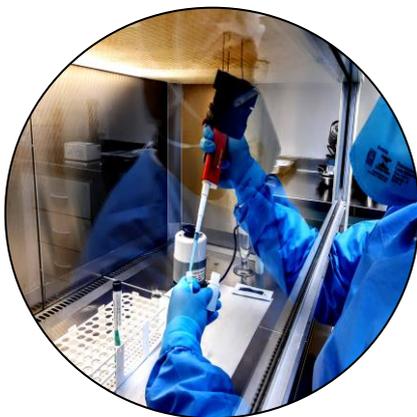
O teste *TB Ag MPT64* é um teste qualitativo de identificação imunocromatográfica para o *cMTb*. O teste possui anticorpos monoclonais fixados na membrana de nitrocelulose como material de captura. Anticorpos conjugados com partículas de ouro capazes de reconhecer o epítipo do MPT64 são utilizados para detecção e captura do antígeno em um ensaio do tipo sanduíche. Quando a amostra é aplicada à cavidade, a mesma flui através da membrana e o anticorpo conjugado de ouro coloidal liga-se ao antígeno MPT64 presente na amostra, forma um complexo antígeno-anticorpo conjugado. Este complexo, ao passar pela região de teste se liga aos anticorpos monoclonais fixados, produzindo uma linha colorida. Na ausência de MPT64 na amostra testada, não ocorre formação da linha teste (OLIVEIRA, 2016).

Identificação do cMTb pelo Método de MPT64

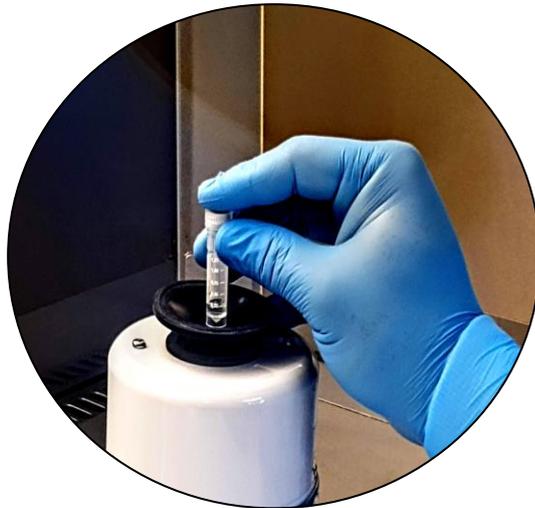
1. Preparar a cabine de segurança biológica;
2. Separar e fazer a assepsia com álcool 70% de todo o material que será utilizado antes de introduzi-lo na CSB e forrar com papel absorvente a área da cabine onde será realizado o procedimento.
3. Com a alça bacteriológica estéril, retirar 3-4 colônias do meio de cultura;



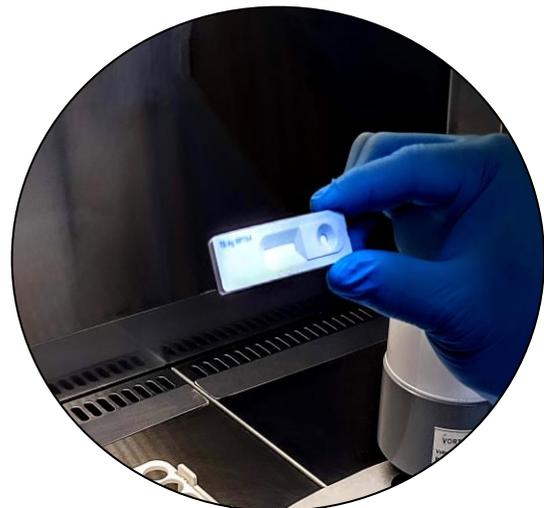
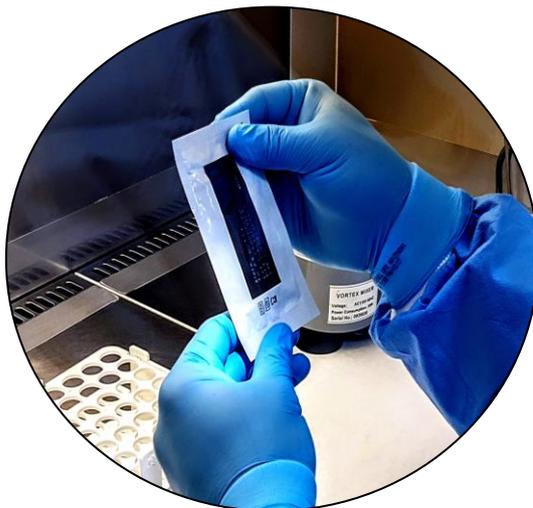
4. Suspendir essas colônias em 200 μ L de solução tampão de extração presente no kit TB Ag MPT64 (esta etapa pode variar conforme fabricante, neste caso recomenda-se seguir a bula disponibilizada pelo mesmo);



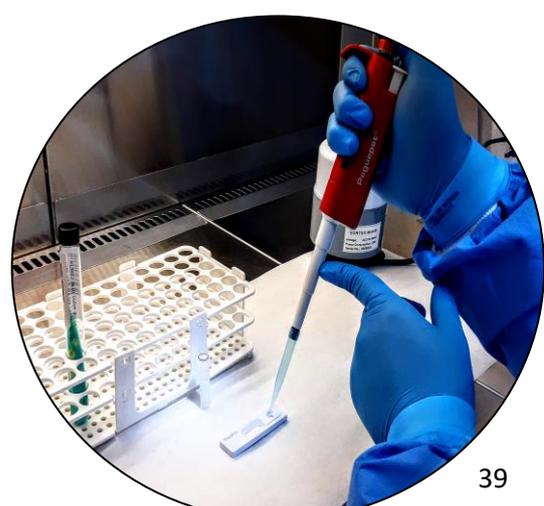
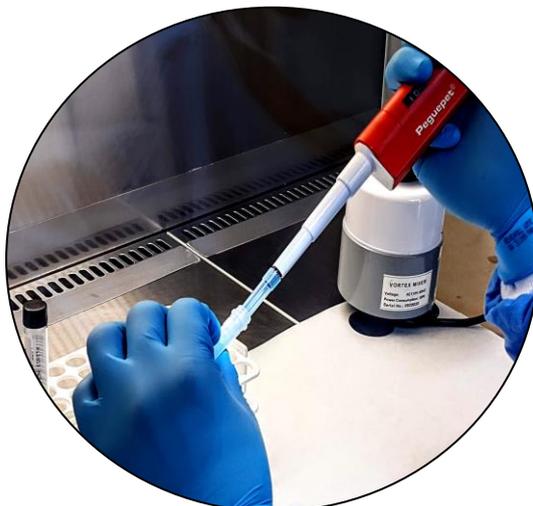
5. Homogeneizar bem com a alça bacteriológica e em seguida em agitador tipo vortex;



6. Abrir o dispositivo de teste e identificar com os dados da amostra



7. Transferir para o dispositivo 100 μ L das colônias sólidas em suspensão na solução tampão;



8. Após o aparecimento da cor roxa na janela do resultado, aguardar por até 15 minutos para leitura e interpretação do resultado.

Interpretação do teste:

1. Negativo = Presença de apenas uma tira colorida de controle (tira C) na janela de resultado;
2. Positivo = Presença de duas tiras coloridas (tira T e tira C) na janela de resultado;



3. Inválido = Não aparecimento da tira colorida na posição controle (tira C), neste caso, a amostra deve ser testada novamente;
4. Desprezar o dispositivo de teste, frasco com a suspensão e ponteiros em recipiente rígido para autoclavagem;
5. Realizar a limpeza e descontaminação da cabine de segurança biológica.

Teste de suscetibilidade a fármacos

O teste de suscetibilidade (TS) é uma análise laboratorial realizada para detectar a resistência ou a sensibilidade de um agente bacteriano à fármacos, no caso da micobactéria, permite saber se o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (cMTb) é sensível ou resistente aos fármacos antituberculose. Os métodos que são padronizados e validados quantificam a proporção de mutantes resistentes a cada um dos fármacos contendo a micobactéria que afeta o paciente (BRASIL, 2019).

Diversos métodos convencionais podem ser utilizados para a investigação da sensibilidade, são eles, método das concentrações absolutas, método da razão de resistência e o método das proporções. Esses métodos são considerados precisos por alcançar uma eficiência de 97 a 99% para determinar a atividade de isoniazida e rifampicina; e 92% para etambutol e estreptomicina. No entanto, por serem métodos executados manualmente requer um cuidado maior e está mais passivo ao erro, além de possibilitar a obtenção dos resultados num tempo médio de 42 dias, ou seja, um tempo relativamente alto se a intervenção, como a modificação do esquema terapêutico, for necessária (CASTEX et al, 2017).

Opcionalmente, outros métodos, também validados e recomendados pelo Ministério da Saúde, têm sido apontados como padrão ouro para realização do teste de suscetibilidade, dentre eles, destacam-se dois métodos: o método automatizado que utiliza um meio de cultura líquido conhecido como MGIT, com possibilidade de resultados resistentes disponíveis entre 5 e 13 dias; e sensíveis em 13 dias; e o método SIRE-Nitratase, com possibilidade de resultados resistentes e sensíveis entre 7 e 14 dias. Considerando o tempo para liberação de resultados e o custo, o método SIRE-Nitratase é apontado como o mais acessível, tendo em vista que este método não necessita de sistema automatizado para leitura, o que o torna mais barato (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

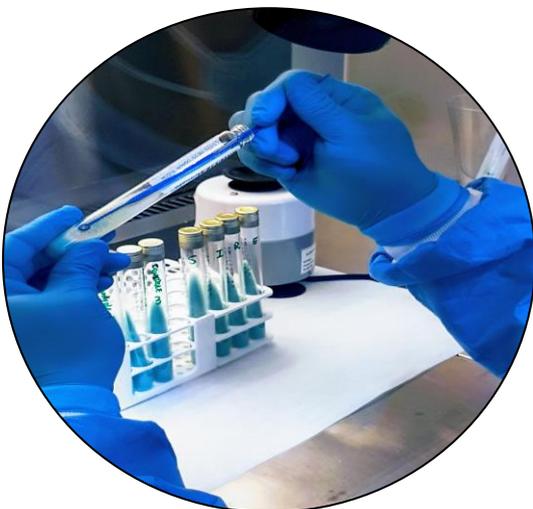
O método SIRE-Nitratase foi desenvolvido a partir de uma parceria entre a Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB), a Universidade

Federal de Minas Gerais (UFMG) e a PlastLabor Brazilian Industry. O teste de redução do nitrato foi descoberto em 1879 e usado amplamente para diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* das micobacterias não tuberculosas. Baseado neste fundamento o teste de suscetibilidade SIRE-Nitratase determina se a *M. tuberculosis* é resistente ou sensível aos fármacos utilizando a nitrato redutase em meio de cultura Lovestein-Jensen. O método tem sido descrito como adequado tanto para os laboratórios de referência quanto para a descentralização do teste de suscetibilidade para os laboratórios de micobacteriologia de pequeno porte. O método se baseia na redução do nitrato em nitrito exercido pela enzima nitrato redutase presente na *M. tuberculosis*. A presença do nitrito é revelada ao adicionar um reagente específico que proporciona o aparecimento de uma coloração rosa no meio de cultura (MIRANDA et al., 2017).

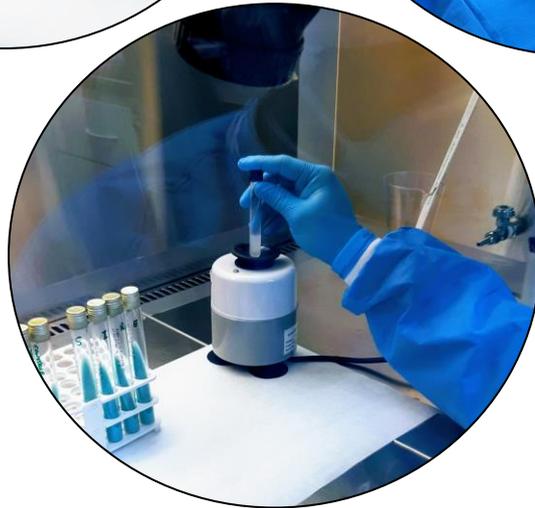
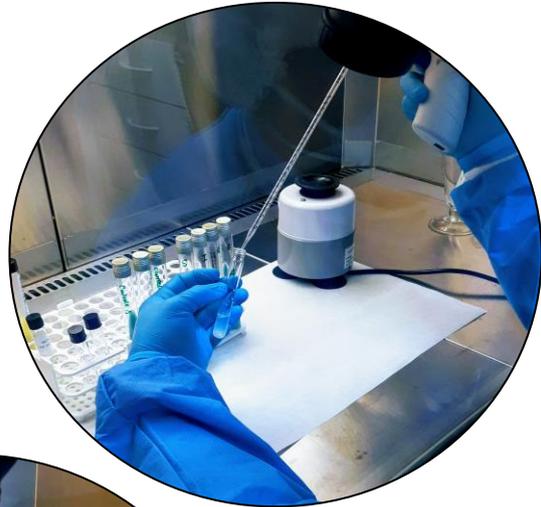
Teste de sensibilidade pelo método de SIRE-Nitratase

Preparação da suspensão bacteriana

1. Preparar 3 tubos seguidos, no primeiro tubo adicionar 5-6 pérolas de vidro (tubo A), no segundo adicionar 3 mL de água estéril (tubo B) e no terceiro adicionar 4,5 mL de água estéril (tubo C).
2. Transferir com alça bacteriológica descartável estéril 20 colônias em sua fase de crescimento log para o tubo A.



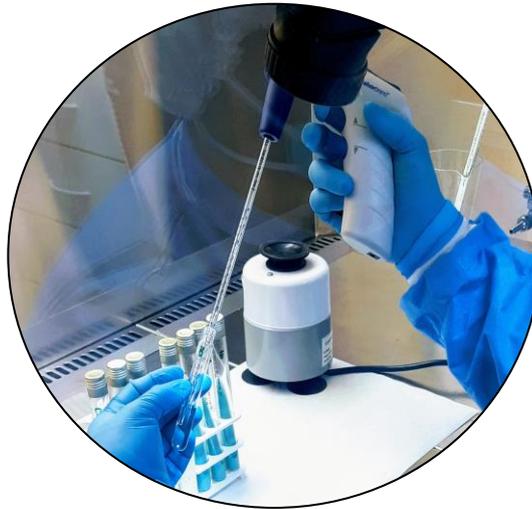
3. Homogeneizar em agitador tipo vortex por 10 a 20 segundos, em seguida retirar 2 mL do tubo B e transferir para o tubo A, homogeneizar por mais 10 a 20 segundos, deixar em repouso por 10 minutos para sedimentação dos aerossóis.



4. Transferir o sobrenadante do tubo A para o tubo B, por gotejamento, para ajustá-lo ao tubo 1 da escala de McFarland.



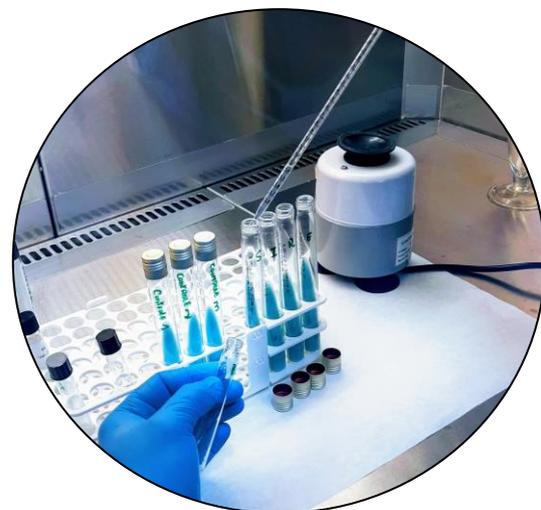
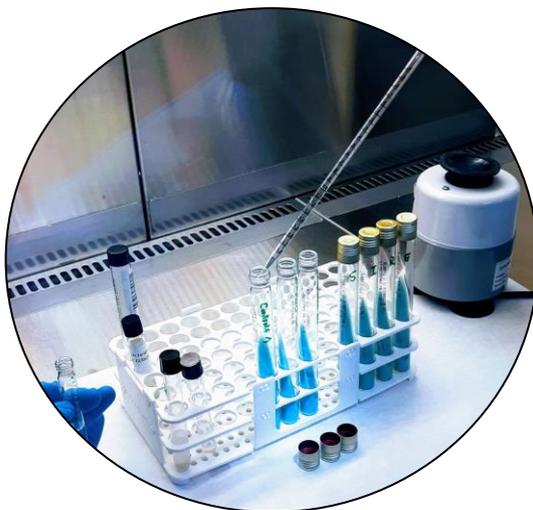
5. Transferir 0,5 mL da suspensão do tubo B, previamente ajustado a escala de McFarland, para o tubo C, obtendo assim uma diluição 1:10.



Inoculação da suspensão nos meios

1. Cada kit é composto por sete tubos nos quais quatro são compostos por meio de cultura Lowestein-Jensen e os fármacos estreptomina, isoniazida, rifampicina e etambutol; e três contêm apenas o meio de cultura Lowestein-Jensen e são destinados ao controle.

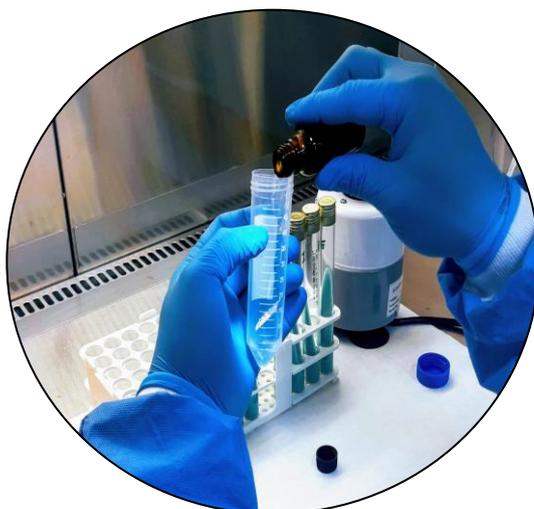
2. Para cada meio contendo as drogas adicionar 200 μ L da suspensão bacteriana ajustada na escala de McFarland e nos três tubos controles adicionar 200 μ L da suspensão diluída 1:10.



3. Rosquear os tubos sem fechar completamente e incubar por 24 horas em posição vertical a 37°C. Após este período fechar completamente os tubos para evitar a evaporação do líquido e manter em incubação a 37°C por 7, 10 ou 14 dias dependendo do resultado da revelação do tubo controle.

Leitura do teste

1. Preparar a solução reveladora misturando 1 parte da solução A + 2 partes da solução B + 2 partes da solução C (disponibilizado pelo fabricante);



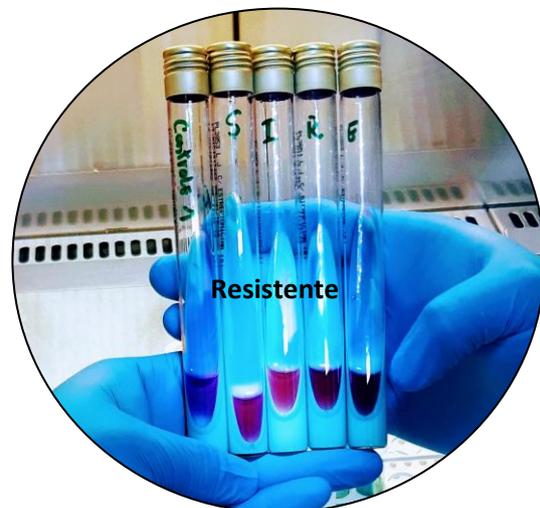
2. Após 7 dias de incubação adicionar com uma pipeta 500 µL da solução reveladora no tubo controle 1. Se ocorrer mudança de cor, isto é, de incolor para rosa, adicionar a solução reveladora também nos tubos com drogas (esse resultado indica que houve crescimento bacteriano). Nesse caso os tubos controles 2 e 3 poderão ser descartados. Liberar o resultado segundo a interpretação dos resultados.



3. Se não houver mudança de cor no tubo controle 1 esse deverá ser descartado e os outros (2 e 3) deverão ser reincubados. No décimo dia repetir o mesmo procedimento com o tubo controle 2. Se não ocorrer mudança de cor no tubo esse deverá ser descartado e o tubo controle 3 deverá ser reincubado até o décimo quarto dia e repetir o procedimento de revelação das drogas. Se não houver mudança no tubo controle 3 toda o teste deverá ser refeito.

Interpretação dos resultados

O isolado bacteriano deve ser considerado resistente quando a cor do tubo com fármaco for igual ou mais intensa que a cor desenvolvida no tubo controle. A cepa deve ser considerada sensível quando não houver mudança de cor ou a coloração for menos intensa nos tubos com fármacos, em relação aos tubos controles.



Agradecimentos

A todos os profissionais do Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria (ENSP/FIOCRUZ), em especial aos do Laboratório de Diagnóstico, Ensino e Pesquisa (LADEP) abaixo listados:

Aldalea Ignácia Teles
Débora da Silva Sabino
Eloiza Paula de Freitas Trindade
Fernanda Bastos dos Passos
Glísia Mendes Tavares Gomes
Joyce Eliza de Oliveira Souza
Luciana Galdino Portugal
Priscila Figueira Soares
Riany da Silva Silveira
Selma do Rosário Lima
Shirley da Silva de Moraes Farias

Aos revisores:

Dra. Christiane Leal Corrêa (UERJ)
Dr. Alexandre Ribeiro Bello (UERJ)
Dra. Helena Keiko Toma
Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira (FIOCRUZ)
Dra. Guacira Corrêa Matos (UFRJ)

“Nenhuma sociedade que esquece a arte de questionar pode esperar encontrar respostas para os problemas que a afligem”.

Zygmunt Bauman

Referências

ABE C, HIRANO K, TOMIYAMA T. Simple and Rapid Identification of the Mycobacterium tuberculosis Complex by Immunochromatographic Assay Using Anti-MPB64 Monoclonal Antibodies. *J of Clin Microbiology*, Nov. 1999, p. 3693–3697.

ANVISA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 222, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3427425> Acesso em: 10/09/2019

BASTOS GM, CEZAR MC, MELLO FCQ, CONDE MB. Prevalência de resistência primária em pacientes com tuberculose pulmonar sem fatores de risco conhecidos para resistência primária. *J. bras. pneumol.* vol.38 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2012.

BRASIL DF. Manual de Recomendações Para Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde, 2019. Disponível em www.saude.gov.br/bvs Acesso em: 13/09/2019.

BRASIL DF. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Ed. 2008.

BVS (Biblioteca Virtual em Saúde); **Dicas de Saúde**, novembro de 2007; disponível em http://bvsmis.saude.gov.br/html/pt/dicas/dica_tuberculose.html, acessado em 21/07/10.

CARNEIRO MDS, NUNES LS, DAVID SMM, DIAS CF, BARTH AL, UNIS G. Doença pulmonar por micobactéria não tuberculosa em um cenário de alta incidência de tuberculose no Brasil. *J Bras Pneumol*, 44 (2): 106-111, 2018.

CASTEX MG, ABRANTES SMP. Validação de método analítico para a determinação de tuberculostáticos em formulação de dose fixa combinada por eletroforese capilar. *Rev Virt Qui*, v.9, n.6, 2017

CEZAR MC. Diagnóstico e Tratamento da Tuberculose Latente. *Pulmão RJ*, 2012, 21 (1): 41-45.

CETRANGOLO N. **Prevalência da M. tuberculosis em paciente HIV resistente à Rifampicina no PCR do GeneXpert do HUGG.** Dissertação: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina, 2018.

COELHO AGV, FARACHE FA, NIERO R, DUQUE JG. Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o isolamento de micobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 57-61, 1999.

COELHO FS, MARQUES EA. Etiologia da tuberculose. *J Bras Saúd Ciên Bio*, Ano 5, Julho / Dezembro de 2006.

Costa RR, Silva MR, Rocha AS, Abi-Zaid KCF, Junior AAF, Souza DMK, Bonan PRF. Tuberculose: perfil epidemiológico em hospital referência no tratamento da doença. *Rev Med Minas Gerais*, 24(Supl 5):S57-S64, 2014

CUNHA EA. A diagnosis of pulmonary tuberculosis and drug resistance among inmates in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 51, n. 3, p. 324- 330, abr./jun. 2018.

CUNHA, EA. Incidence and transmission patterns of tuberculosis among indigenous populations in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 109, n. 1, p. 108-113, fev. 2014.

DIVISÃO DE TUBERCULOSE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”. Controladoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado de Saúde. São Paulo. Mudanças no tratamento de tuberculose. *Rev. Saúde Pública*, 44(1):197-9, 2010

GALDINO JH. Adesão e conhecimento de profissionais da saúde em relação às precauções para aerossóis. *Rev. RENE*, v. 16, n. 4, p. 514-521, 2015.

GAGNEUX S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nature reviews | microbiology*, v.16, 2018.

GOMES, JPM. Gênero Mycobacterium spp. Atualidade 2013. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Mycobacterium%204-2013-1.pdf> Acessado em: 18/10/2019

IN METRO – Instituto Nacional de Metrologia. “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão 02. 2007

KLEINNIJENHUIS J, OOSTING M, JOOSTEN LAB, NETEA MJ, VAN CR. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Dev. Immunol.* ID 405310: 1-12, 2011

KORKEGIAN A, ROBERTS DM, BLAIR R, PARIS HT. Mutations in the essential arabinosyltransferase EmbC lead to alterations in Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* 2014.

KUDOH S, KUDOH T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull World Health Organ.* 1974;51(1):71-82.

LARSON CL. **Mycobacterium tuberculosis (Zopf) Lehmann e Neumann (ATCC ® 25177™)** Disponível em: tcc.org/products/all/25177.aspx#history Acesso em: 03/09/2019

MALACARNE J, HEIRICH AS, CUNHA EAT, KOLTE IV, SANTOS RS, BASTA PC. Desempenho de testes para diagnóstico de tuberculose pulmonar em populações indígenas no Brasil: uma contribuição do Teste Rápido Molecular. *J Bras Pneumo*, v45,n2, 2019

MARQUES M, CUNHA EA, RUFFINO-NETTO A, ANDRADE SM. Drug resistance profile of Mycobacterium tuberculosis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, 2000-2006. *J Bras Pneumol.* 2010;36(2):224-31.

MEDEIROS RFM. **Diagnóstico Rápido de Resistência de Mycobacterium tuberculosis a Rifampicina e Isoniazida pelo Método de Nitrato Redutase.** Dissertação Fundação Oswaldo Cruz Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica Biblioteca de Saúde Pública, 2016.

MELO FAF. Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.27-34, Jan/Mar. 2003.

MELLO KG, MELLO FC, BORGA L, ROLLA V, DUARTE RS, SAMPAIO EP. Características clínicas e terapêuticas da doença micobacteriana pulmonar não tuberculosa, Brasil, 1993-2011. **Emerg Infect Dis**, 19 (3): 393-9, 2013.

MENSCHHEIN CL, SADIN GR, SAKAE TM. Perfil epidemiológico dos casos de tuberculose multirresistente no estado de Santa Catarina entre 2004 e 2008. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.38, n.4, p.81-86, 2009.

MENDES JM, LOURENÇO MC, FERREIRA RMC, FONSECA LS, SAAD MHF. Resistência a drogas em cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas de amostras de escarro de pacientes ambulatoriais sintomáticos – Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. **J. bras. pneumol.** v.33 n.5 São Paulo set./out. 2007.

MENDES NMJA, COSTA RR, DIAS AMN, LOPES CB, SOUZA DMK, SILVA MR, MESQUISTA HL. Perfil de resistência a fármacos antituberculose em um hospital de referência do Estado de Minas Gerais. **Rev Med Minas Gerais** 2014; 24 (Supl 5): S43-S46

MICHELETTI VCD, MOREIRA JS, RIBEIRO MO, KRITSKI AL, BRAGA JU. Tuberculose resistente em pacientes incluídos no II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos Antituberculose em Porto Alegre, Brasil. **J Bras Pneumol**, 40(2):155-163, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico/Brasil livre da tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença. **Ministério da Saúde**, v.50, Mar 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano nacional pelo fim da tuberculose/ Brasil livre da tuberculose. **Ministério da Saúde**, 2017. Disponível em www.saúde.gov.br/bvs
Acesso em: 12/10/2019

MIRANDA SS, ALMEIDA IN, LOPES ML, FIGUEIREDO JR, FIGUEREDO LJA, KRITSKI AL, CARVALHO WS, MANSUR MFFO. Evaluation of the Commercial Kit SIRE Nitratase for detecting resistant Mycobacterium tuberculosis in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 50(4):550-553, July-August, 2017

MOUTINHO, ILD. Tuberculose: Aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Rev Med Minas Gerais**, 2011. 21(1): 42-48.

MÜLLER I, ARAÚJO L, BARROS B, ARRUDA SM, QUEIROZ A. Avaliação de alterações moleculares desencadeadas pela remodelagem lipídica da parede do Mycobacterium Tuberculosis. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 54, 2018.

OLIVA HNP, OLIVEIRA AG, GODINHO ACVCQ, NUNES FM. Incidência de tuberculose extrapulmonar. **Rev Soc Bras Clin Med**. 2019;17(2):63-5

OLIVEIRA GS, CASTRO GRCL, SILVA JX, NAVES JANETH OS, FILHO CMRM. Laboratory identification of mycobacteria from respiratory samples of patients with suspected pulmonary tuberculosis in samples isolated at the Central Laboratory of Public Health of the Federal District (LACEN-DF). **J. Health Biol Sci**. 2016, 4(3):187-192.

OLIVEIRA MSC, LIMA CAM, MOURA MMF. Análise do método ogawa-kudoh e comparação com o método lauril sulfato de sódio-lowenstein-jensen para diagnóstico da tuberculose no estado de Rondônia. **Rev Pesq Criação** - Volume 10, Número 2, Julho/Dezembro de 2011: 127-137

OPOTA O, SENN L, PROD'HOM G, MAZZA-STALDER J, TISSOT F, GREUB G. Added value of molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low-prevalence country. **Clin Microbiol Infect**, 22(7):613-9, 2016.

PARIMANGO R, CASTILHO DC, VELASQUEZ ML. Comparación de los medios Ogawa y Löwenstein-Jensen en el aislamiento de Mycobacterium tuberculosis de pacientes con tuberculosis pulmonar. Hospital Regional Docente de Trujillo, Perú. **Rev. Med. Vallejana**, 2017, vol.4, no.1, p.24- 31. ISSN 1817-2075.

PASCHUALINOTO AL, SILVA RRF, CARMO AMS. Padrões de Resistência a Fármacos em Pacientes com Tuberculose Pulmonar IAL Santo André. **Rev Bras Ciências Saúde**. 2012; 10(31):67-70.

PAULO LDR, MOREIRA GU , FRADE RCSM , OLIVEIRA VAT , NOGUEIRA MC. Descentralização do diagnóstico e tratamento da tuberculose: possibilidades e limitações da atenção primária. **Rev. APS**. 2016 jan/mar; 19(1): 161 - 161.

RAMOS JAS, VIVEIROS M. **Transporte de brometo de etídio através da parede celular de *Mycobacterium smegmatis*: desenvolvimento e aplicação de metodologias de quantificação do transporte e correlação com a resistência aos antibióticos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Nova de Lisboa, 2010.

RIBEIRO MO. **Contribuição da Cultura para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar Usando o Método Ogawa-Kudoh em Quatro Estados do Brasil**. In: CONGRESSO DE MICROBIOLOGIA – SIMPÓSIO DE MICOBACTÉRIAS – 2005 IPB-LACEN/RS;LACENES -Núcleo de Doenças Infeciosas-UFES;LACEN-MS; IAL – Instituto Adolfo LutzSP.2005.

RIBEIRO FH. **Comparação do método de Ogawa Kudoh com os métodos de Lauril sulfato de sódio e Fosfato Trisódico para cultivo de micobactérias**. In: ENCONTRO NACIONAL DA TUBERCULOSE, II, 2006, São Paulo. Pôster. Núcleo de Doenças Infeciosas-UFES; LACEN-ES; CGLAB-MS, Vol. 32 - Supp. 3, 2006.

ROCHA JL. Tuberculose multirresistente. **Pulmão**, v.17, n.1, p.27-32, 2008

SANTOS JS, BECK ST. A coinfeção tuberculose e HIV: um importante desafio – Artigo de revisão. **Rev Bra Anal Clin**, vol. 41 (3): 209-215, 2009.

SANTOS AFS, LIMA AF. Tuberculose Pulmonar e a formação do Granuloma: Uma Revisão da Literatura. **Ciências Biológicas e de Saúde**, 2017. V.4, n.2, 111-124.

SILVA NS, ALMEIDA KRH, NETO CAM, ARAÚJO AA, OLIVEIRA SR. Análise comparativa da técnica de baciloscopia no diagnóstico da tuberculose pulmonar frente ao GeneXpert em amostras de pacientes da cidade de Recife, Pernambuco. **RBAC**, 51(1):65-9, 2019.

SOUSA EO. Dissertação: **CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS E DE RESISTÊNCIA A FÁRMACOS DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* ASSOCIADOS COM CASOS DE TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE NA BAHIA, BRASIL**. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ, 2012.

SOUZA MC. **Estudo dos Mecanismos Responsáveis pelo acúmulo de linfócitos durante a pleuresia induzida por *Micobacterium bovis* – BCG**. Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, 2006.

STEENKEN W, BALDWIN ER. *Mycobacterium tuberculosis* subsp., 1934. Disponível em:
<https://www.atcc.org/products/all/27294.aspx#history> Acesso em: 03/09/2019.

VIEIRA RCA. Perfil epidemiológicos dos casos de tuberculose do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.10, n.1, p.56-65, 2007.

WHO (World Health Organization) Global Tuberculosis Control: **WHO Report**, 2017.