

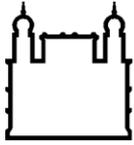
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Mestrado em Medicina Tropical

**MICOBACTÉRIAS: IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SENSIBILIDADE
A TUBERCULOSTÁTICOS EM AMOSTRAS ISOLADAS NO
LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DO ESTADO DO
PIAUI, JANEIRO 2014 A MARÇO DE 2015**

MARIANA OLIVEIRA SANTOS

Teresina-PI
Novembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

MARIANA OLIVEIRA SANTOS

Micobactérias: identificação e perfil de sensibilidade a tuberculostáticos em amostras isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Piauí, janeiro 2014 a março de 2015

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Medicina Tropical

Orientadora: Maria Helena Féres Saad

TERESINA-PI
Novembro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

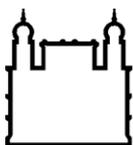
S237 Santos, Mariana Oliveira

Micobactérias: identificação e perfil de sensibilidade a
tuberculostáticos em amostras isoladas no Laboratório Central de Saúde
Pública do Estado do Piauí, janeiro de 2014 a março de 2015 / Mariana
Oliveira Santos. – Teresina, 2015.
xvi, 67 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2015.
Bibliografia: f. 55-67

1. Tuberculose. 2. Micobactéria não tuberculosa. 3. Xpert. 4.
Resistência. 5. MDR. I. Título.

CDD 616.995



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

MARIANA OLIVEIRA SANTOS

**MICOBACTÉRIAS: IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SENSIBILIDADE A
TUBERCULOSTÁTICOS EM AMOSTRAS ISOLADAS NO LABORATÓRIO
CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DO ESTADO DO PIAUÍ, JANEIRO 2014 A
MARÇO DE 2015**

ORIENTADORA: Maria Helena Féres Saad

Aprovada em: 20/11/2015

EXAMINADORES:

Dr. Filipe Aníbal Carvalho Costa - Presidente (FIOCRUZ/IOC)
Dra. Liline Maria Soares Martins (UESPI/FACIME)
Dr. Vladimir Costa Silva (UFPI)

Teresina, 20 de novembro de 2015



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Medicina Tropical de **Mariana Oliveira Santos**, sob orientação da Dr^a. Maria Helena Feres Saad. Ao vigésimo dia do mês de novembro de dois mil e quinze, realizou-se às nove horas, no Auditório da FAPEPI, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **Identificação de micobactérias e perfil de sensibilidade a tuberculostáticos em pacientes atendidos em um Centro de Referência no Piauí** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Vladimir Costa Silva - UFPI/PI, Dr^a. Lílne Maria Soares Martins - UFPI/PI e como suplentes: Dr. Regis Bernardo Brandim Gomes - FIOCRUZ-PIAUÍ e Dr. Kelsen Dantas Eulálio - UFPI/PI. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Martha Cecilia Suarez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 20 de novembro de 2015.

Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (Presidente da Banca):

Dr. Vladimir Costa Silva (Membro da Banca):

Dr^a. Lílne Maria Soares Martins (Membro da Banca):

Dr^a. Martha Cecilia Suarez Mutis (Coordenador do Programa):

Dedico este trabalho, à minha família, especialmente aos meus pais, José Pedro dos Santos (in memoriam) e Ana Lúcia Costa de Oliveira pelo incentivo e apoio incondicionais que sempre me dedicaram.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pelas oportunidades, pela certeza de uma força criadora que permite ao homem neste mundo, superar obstáculos e alcançar grandes realizações!

Aos meus pais, José Pedro dos Santos (*in memorian*) e Ana Lúcia Costa de Oliveira pela orientação quanto a importância do estudo e apoio incondicionais;

À minha Orientadora, Profa. Phd Maria Helena Féres Saad pela dedicação, apoio e críticas extremamente importantes e enriquecedores durante a árdua tarefa de orientar-me à distância, sobre tema tão complexo e relevante para a saúde pública, na elaboração desta tese.

Aos professores da IOC/FIOCRUZ, por compartilharem seus conhecimentos, especialmente, ao Professor Dr Filipe Costa Anibal, na análise estatística;

Aos Professores, Dr Kelsen Dantas Eulálio, Dra Maria do Amparo Salmito, Dra Liline Maria Soares Martins, Dr Vladimir Costa Silva e Dr José Adail Fonseca de Castro (*in memorian*) por compartilharem seus conhecimentos.

À IOC/FIOCRUZ, CRPHF/FIOCRUZ, À Secretaria de Saúde do Estado do Piauí, FACIME e LACEN- PI, pelo apoio institucional.

Aos amigos e colegas de trabalho, atuantes na área da tuberculose pela contribuição profissional na elaboração deste estudo, especialmente, Symonara Karyna, Juana Vitória, Walterlene Gonçalves, Ivone Venâncio e Gabriela Araújo.

Aos funcionários do LACEN-PI, pelo apoio, especialmente ao amigo Denis Rômulo, por contribuir com suas explicações sobre a utilização da ferramenta GAL na coleta de dados.

Aos meus irmãos, especialmente, às irmãs Kellen Cristiane e Ana Cristina, pelo suporte e incentivo motivacional em todos os momentos.

Ao Talvany, pelo incentivo, apoio e explicações sobre estatística.

Aos colegas do mestrado, pelo espírito de solidariedade, especialmente a minha amiga Diana Marisa pelo incentivo nos momentos mais difíceis do Mestrado.

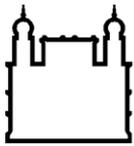
À minha tia, Maria de Nasaré dos Santos Ribeiro, por acreditar no estudo, incentivar e torcer pelo meu êxito neste objetivo.

E, ao meu querido sobrinho Thales Henrique, pela presença cativante e por trazer alegria, tornando a caminhada nestes dias mais gratificante.

*“O prêmio de uma boa ação é tê-la praticado”
Sêneca*

“Se tiverdes fé do tamanho de um grão de mostarda, nada vos será impossível.”

Mateus 17:20



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

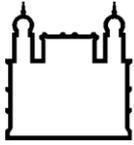
Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

Micobactérias: identificação e perfil de sensibilidade a tuberculostáticos em amostras isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Piauí, janeiro 2014 a março de 2015

Nas infecções causadas pelo gênero *Mycobacterium* identificar a espécie é importante para distinguir entre as cepas e agrupá-las por critérios de interesse para microbiologistas e clínicos, influenciando inclusive no esquema de tratamento a ser aplicado. Segundo a World Health Organization, em 2014 a tuberculose atingiu o mesmo patamar que a infecção por HIV (Human Immunodeficiency Virus) em relação à mortalidade. Por outro lado, as micobacterioses por micobactérias não tuberculosas (MNT) vêm aumentando, mas como não é de notificação compulsória, pouco se sabe da diversidade de espécies que acometem os pacientes no estado do Piauí. Assim, o presente estudo teve como objetivo, estimar a frequência de infecção por Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e MNT, correlacionar os métodos microbiológicos e moleculares utilizados na sua identificação e descrever o perfil de sensibilidade a tuberculostáticos nas amostras de *M. tuberculosis*, isoladas de pacientes referenciados ao Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí (LACEN-PI) no período de janeiro 2014 a março de 2015. Para tal, foi realizado estudo descritivo transversal em 142 espécimes clínicos de pacientes, correspondendo a 20,1% dos casos suspeitos enviados ao LACEN-PI. Na maioria dos casos a espécie *M. tuberculosis* foi identificada (69,7%; 99/142) e em 9,9% (14/142) foram isoladas MNT. O restante dos casos (20,4%; 29/142) não foi possível fazer o diagnóstico definitivo. As espécies de micobactérias não tuberculosas identificadas foram *M. abscessus* (3,5%); *M. avium* (1,4%), *M. intracellulare* (1,4%), *M. asiaticum* (0,7%), *M. szulgai* (0,7%) e *M. kansasii* (0,7%), e maioria dos casos era do sexo masculino (63,4%; 9/14) e apenas 1/64 (1,6%) era HIV positivo. Comparando os métodos laboratoriais utilizados na identificação de *M. tuberculosis* foi evidenciado 100% de concordância entre a plataforma automatizada geneXpert (Xpert MTB/ RIF) e o cultivo microbiológico *in vitro*, em 56 espécimes de pacientes com pneumopatia pulmonar. A frequência de amostras resistentes às drogas testadas foi de 7,8% (5/64), das quais, três eram multidroga resistente e uma extensivamente resistente. Conclui-se que, as infecções por *M. tuberculosis* foram mais frequentes que as causadas por micobactérias não tuberculosas e a resistência às drogas apresentou-se mais elevada que a taxa mundial (3,3%). As espécies MNT identificadas são potencialmente patogênicas e é importante notar que por questões metodológicas não foi possível confirmar os 20,4% dos suspeitos, portanto, maior atenção deve ser dada na correta coleta dos espécimes clínicos. A utilização da metodologia Xpert na rotina laboratorial, comparada a metodologias microbiológicas, demonstrou alta sensibilidade e especificidade na detecção de resistência à rifampicina e rapidez na produção do resultado.

Palavras-chaves: Tuberculose; Micobactéria Não Tuberculosa; Xpert; Resistência; MDR



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

Mycobacteria: identification and sensibility profile to antituberculosis drugs in samples isolated in the Piauí State Public Health Central Laboratory, January 2014 to March 2015

In infections caused by *Mycobacterium* genus identify the species is important to distinguish between strains and group them by criteria of interest to microbiologists and clinicians, including influencing the treatment regimen to be applied. According to the World Health Organization, in 2014 TB reaches an equal footing that of the HIV (Human Immunodeficiency Virus) infection on mortality. On the other hand, mycobacteriosis by nontuberculous mycobacteria (NTM) has increased, however as it is not of mandatory notification and little is known about the diversity of species that affect patients in the state of Piauí. The present study aimed to estimate the frequency of *Mycobacterium tuberculosis* and NTM infections, correlate the microbiological and molecular methods used to identify them and describe the sensibility profile of the TB drugs in *M. tuberculosis* samples isolated from patients referred to the Piauí State Public Health Central Laboratory (LACEN-PI), from January 2014 to March 2015. To this end, a cross-sectional descriptive study was performed on 142 clinical specimens of patients, corresponding to 20.1% of suspected cases submitted to LACEN-PI. In most cases the species *M. tuberculosis* was identified (69.7%, 99/142) and 9.9% (14/142) were isolated NTM. In the remaining cases (20.4%; 29/142) it was not possible to make a conclusive diagnosis. The nontuberculous mycobacteria species identified were *M. abscessus* (3.5%); *M. avium* (1.4%), *M. intracellulare* (1.4%), *M. asiaticum* (0.7%), *M. szulgai* (0.7%) and *M. kansasii* (0.7%) in most of the cases the subjects were male (63.4%; 9/14) and only 1/64 (1.6%) were HIV positive. Comparing the laboratory methods used in the identification of *M. tuberculosis* 100% agreement was evidenced between the automated platform GeneXpert (Xpert MTB/RIF) and the microbiological culture *in vitro*, in 56 specimens of patients with pulmonary pneumonitis. The frequency of strains resistant to the tested drugs was 7.8% (5/64), of which three were multidrug-resistant and one was extensively drug-resistant. In conclusion, the *M. tuberculosis* infections were more frequent than those caused by nontuberculous mycobacteria and drug resistance was found to be higher than the global rate (3.3%). The identified NTM species are potentially pathogenic and it is important to note that for methodological issues 20.4% of the suspects could not be confirmed, therefore, greater attention should be paid to the correct collection of clinical specimens. The use of the Xpert method in laboratory routine compared to microbiological methods showed high sensibility and specificity to the detection of rifampicin resistance and speed in the result production.

Keywords: Tuberculosis; Nontuberculous Mycobacteria ; Xpert; Resistance; MDR

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 História	1
1.1.1 Importância e Descoberta do Gênero <i>Mycobacterium</i>	1
1.1.2 Paleomicrobiologia.....	1
1.2 Características das micobactérias	2
1.3 Epidemiologia	6
1.3.1 Epidemiologia da Tuberculose no mundo	6
1.3.2 Epidemiologia da Tuberculose no Brasil.....	6
1.3.3 Tuberculose Extrapulmonar no Brasil	7
1.3.4 Micobactérias Não Tuberculosas.....	8
1.4 Patogênese e Infectologia	11
1.5 Diagnóstico	13
1.6 Sensibilidade a Tuberculostáticos	19
1.7 Tratamento	20
1.8 Justificativa	24
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	26
2.1 Objetivo Específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Desenho do Estudo	27
3.2 Descrição da área do estudo	27
3.3 Local de recrutamento do sujeito da pesquisa	27
3.4 Período	28
3.5 População	28
3.6 Instrumento da coleta de dados clínicos-epidemiológicos e laboratorial	28
3.7 Métodos de Confirmação Diagnóstica	29
3.7.1 Baciloscopia	29
3.7.2 Cultura	30

3.7.3	Identificação	32
3.7.4	Testes de susceptibilidade	34
3.8	<i>Análise Estatística</i>	37
4	RESULTADOS	38
4.1	<i>Casuística</i>	38
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÕES	53
7	PERSPECTIVAS	54
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9	APÊNDICES E/OU ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Mamífero da família Herpestidae da qual isolou-se <i>Mycobacterium mungi</i>	3
Figura 1-2 Característica microscópica dos bacilos álcool-ácido resistentes.....	4
Figura 1-3 Representação esquemática da parede celular de <i>Mycobacterium</i>	5
Figura 1-4 Aspecto de colônias em esfregaço coradas por Zielh Neelsen	16
Figura 3-1 Fluxo de processamento de amostras rotineiramente usado na estratégia de identificação dos casos suspeitos de micobacterioses no LACEN-PI.	29
Figura 3-2 Fixação do esfregaço, lavagem da fucsina em água corrente e sentido de leitura lâmina..	30
Figura 3-3 Equipamento automatizado para cultivo de micobactérias em meio de cultura líquida pelo método BACTEC MGIT 960.....	31
Figura 3-4 Preparação da amostra e inserção do cartucho em módulo do equipamento Xpert /RIF MTB PCR-RT	33
Figura 3-5 Fluxograma da realização do método das Proporções em meio Löwenstein-Jensen	35
Figura 3-6 Preparo do inóculo para realização do teste de sensibilidade, a partir de crescimento colonial em meio sólido, em BACTEC MGIT 960.....	36
Figura 3-7 Preparo do inóculo para realização do teste de sensibilidade a partir de meio líquido em BACTEC MGIT 960.....	37
Figura 4-1 Distribuição, de acordo com a idade, dos 142 pacientes diagnosticados com infecção por micobactérias, e cujos espécimes clínicos foram referenciados no LACEN-PI.....	39
Figura 4-2 Frequência de espécies micobacterianas isoladas de 142 pacientes referenciados no LACEN-Piauí no período de janeiro de 2014 a março de 2015.....	40
Figura 4-3 Média de idade, e desvio padrão, entre os pacientes diagnosticados com infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb), por Micobactérias não tuberculosas (MNT) e no grupo com suspeita de MNT referenciados no LACEN-PI.....	41
Figura 4-4 Espécies micobacterianas, com teste positivo para visualização de presença de FC, em amostras isoladas de 107 pacientes com suspeita de infecção referenciados no LACEN-PI, no período de janeiro de 2014 a março de 2015.....	45
Figura 4-5 Resultado do teste de susceptibilidade aos tuberculostáticos realizados em 64 amostras de <i>M. tuberculosis</i> obtidos de espécimes clínicos oriundos de pacientes com tuberculose pulmonar, ou extrapulmonar, referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação de micobactérias não tuberculosas pelo critério de Runyon.....	4
Tabela 2 Lista de micobactérias não tuberculosas (MNT), classificadas de acordo com a patogenicidade:.....	8
Tabela 3 Distribuição geográfica variável das espécies de MNT, associadas à doença, nos diferentes continentes.	10
Tabela 4 Características fenotípicas para distinguir Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CMTB) das Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT).	17
Tabela 5 Frequência de mutantes naturalmente resistentes na população de <i>M. tuberculosis</i> em relação aos principais fármacos utilizados no tratamento da TB	22
Tabela 6 Síntese das características de <i>M. tuberculosis</i> e a ação medicamentosa.	23
Tabela 7 Características dos fármacos para o preparo do teste de susceptibilidade pelo método das proporções em meio sólido de Löwenstein-Jensen.	34
Tabela 8 Distribuição dos casos de tuberculose e micobacterioses por município, referenciados ao LACEN-PI, no período de janeiro de 2014 a março de 2015.	38
Tabela 9 Distribuição, quanto ao sexo, dos 142 pacientes identificados com infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb), por outras micobacterioses não tuberculose (MNT) e com suspeita de infecção por MNT no período janeiro de 2014 a março de 2015.	42
Tabela 10 Distribuição, de acordo com o espécime clínico enviado para diagnóstico, de 142 pacientes identificados com infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb), por outras micobacterioses não tuberculosas (MNT) e com suspeita de infecção por MNT, referenciados no período de janeiro de 2014 a março de 2015.	42

Tabela 11 Resultados do teste molecular, usando a plataforma automatizada GeneXpert baseada na amplificação de genes alvos por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), e do teste microbiológico de cultivo *in vitro*, em 40 espécimes clínicos, referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.....**43**

Tabela 12 Comparação entre os resultados obtidos no procedimento molecular automatizado GeneXpert com a baciloscopia em espécimes pulmonares.....**44**

Tabela 13 Resultados do teste microbiológico de visualização de bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaços corados pelo método de Ziehl Neelsen e cultura *in vitro*, em 43 espécimes clínicos de pacientes com pneumopatia pulmonar referenciados no LACEN-PI no per período de janeiro de 2014 a março de 2015.....**44**

Tabela 14 Padrão de resistência aos fármacos em cinco amostras de *Mycobacterium tuberculosis*, isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.....**46**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AM	Ácido Micólico
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo de Calmette Guérin
BK	Bacilo de Koch
C	Citosina
CAPR	CAPREOMICINA
CBS	Cabine de Biossegurança
CDC	Center for Disease Control
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CMtb	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EMB	Etambutol
ET	Etionamida
FCS	Fluido Cerebrospinal
FDA	Food Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Guanina
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
HIV	Human Immunodeficiency Virus
INH	Isoniazida
KAN	CANAMICINA
LACEN-PI	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Piauí
LJ	Löwenstein – Jensen
Mabo	<i>Mycobacterium abscessus</i>
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
mAGP	mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan
Mav	<i>Mycobacterium avium</i>
MC	Membrana Citoplasmática
MDR-TB	Tuberculose Multidroga Resistente
MIC	Concentração Inibitória Mínima
Mitc	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
Mksi	<i>Mycobacterium kansasii</i>
MNT	Micobactéria Não Tuberculose
MS	Ministério da Saúde
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Myc	<i>Mycobacterium sp</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Positivo
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PCR RT	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
PNB	p-nitrobenzoato
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	Derivado Protéico Purificado
PZA	Pirazinamida
R	Resistente
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucléico
S	Sensível
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral
SM	Streptomicina
SMNT	Suspeita de micobactérias não tuberculosas
SNC	Sistema Nervoso Central
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
SITETB	Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose
TB	Tuberculose
TBE	Tuberculose Extrapulmonar
TBME	Tuberculose Meningoencefálica
TBP	Tuberculose Pulmonar
TCH	Hidrazida ácido tiofeno-2-carboxílico
TDO	Tratamento Diretamente Observado
TTC	Teste Tuberculínico Cutâneo
TS	Teste de sensibilidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UT	Unidades de Tuberculina
WHO	World Health Organization
XDR-TB	Extensively drug-resistant tuberculosis

1 INTRODUÇÃO

1.1 História

1.1.1 Importância e descoberta do Gênero Mycobacterium

Em Março de 1882, o médico alemão Robert Koch, anunciou a identificação e cultivo do agente causador da tuberculose (TB): uma bactéria em forma de bastonete que chamou bacilo da TB. Ele revolucionou a ciência médica, ao descrever e demonstrar como havia encontrado o microrganismo em tecido doente, corá-lo, isolá-lo, e inoculá-lo *in vivo*, reproduzindo a assim a doença em animais de laboratório (BARNES 2000; CAMBAU & DRANCOURT 2014).

Robert Koch, na Alemanha, e Louis Pasteur, na França, foram os principais fundadores da ciência da bacteriologia e Lehmann e Neumann, em 1896, agruparam os microrganismos como pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (COLLINS et al. 1997; SCHULTZ 2011). A descoberta de *M. tuberculosis* (Mtb), por R. Koch, é considerada um dos maiores eventos da história da medicina, sendo ele por isto, agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1905 (SAKULA 1982; SCHULTZ 2011).

A denominação *Mycobacterium* é originária do latim *fungus bacterium*, devido às características de *M. tuberculosis* semelhantes aos fungos em condições de cultivo em meio líquido (COLLINS et al. 1997). Outros bacilos apresentam as mesmas características tintoriais que *M. tuberculosis*, mas diferem quanto a patogenicidade e características de cultivo *in vitro* como é o caso das micobactérias não tuberculosas (MNT) (BRASIL 2008; COLLINS et al. 1997).

De acordo com “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature”, há mais de 169 espécies válidas e de “habitats” variados, pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (EUZÉBY 1997). As espécies agrupam-se dentro do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) ou outros complexos de MNT, excetuando-se *Mycobacterium leprae* (BRASIL 2008).

1.1.2 Paleomicrobiologia

Os primeiros relatos escritos sobre a TB foram encontrados na Índia e datam de 700 a.C. O médico grego Hipócrates (460–375 a.C.) é etimologicamente responsável pelo termo tísico (Gre. *phthisikós* [Lat. *Phthisicus*] = excessivamente magro, consumido), utilizado para

se referir a TB. Aristóteles foi um dos primeiros a descrever o seu aspecto contagioso, dando origem a Tisiologia, área da medicina que estuda a tuberculose e outras doenças pulmonares.

A paleomicrobiologia tem contribuído para demonstrar a existência da doença ao longo do tempo (ENGEL et al. 2004; CAMBAU & DRANCOURT 2014). Evidências sobre a presença de TB envolvendo fatos históricos datam de 3.700 a 1.000 a.C. Em múmias de personalidades da 21ª dinastia do Egito (Tebas, 1070 a.C. até 945 a.C), encontrou-se lesões compatíveis com a tuberculose (ROSEMBERG 1999). As dúvidas sobre a presença da TB nas Américas pré-colonial foram elucidadas por estudos paleomicrobiológico. Após o isolamento de DNA de *M. tuberculosis* de lesão pulmonar da múmia de uma jovem mulher (1.000 a.C.), tornou-se evidente a presença da doença neste período. Os relatos de epidemias e mortes entre a população indígena no período da colonização européia, possivelmente se devam por disseminação de cepas mais virulentas de *M. tuberculosis* transmitidos pelos colonizadores europeus (DARLING 2014).

Sabbatani e Fiorini (2015), estudaram os genomas completos de 259 estirpes de CMTB, com o objetivo de caracterizar a diversidade global e reconstruir a história evolutiva do patógeno, estima-se que o CMTB surgiu na África, cerca de 70.000 anos atrás, no Paleolítico médio. Segundo Gutierrez et al. (2005) a diversidade genética intraespécies, é gerada por mutações e por trocas genéticas horizontais. Iwai et al. (2010) sugerem que o bacilo da TB possa ter surgido há cerca de 35.000 anos, através da mutação de uma espécie de micobactéria ambiental.

1.2 Características das micobactérias

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, subordem Corynebacteriacea, ordem Actinomycetales. Similaridades encontradas em estudos taxonômicos colocam algumas espécies em agrupamentos e suas definições como complexos ou grupos (BRASIL 2008). Fazem parte do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) as espécies: *M. tuberculosis* (TB humana), *Mycobacterium bovis* (TB bovina), *Mycobacterium bovis* – BCG (Bacilo de Calmette Guérin, cepa vacinal); *Mycobacterium africanum* (TB humana na Africa), *Mycobacterium microti* (TB em roedores), *Mycobacterium caprae* (TB em caprinos) (NIEMANN et al. 2002), *M. Canetti* (membro mais antigo filogeneticamente, raramente causa doença em humano) *Mycobacterium pinnipedii* (TB em leões marinhos e humanos) (COUSINS et al. 2003) e, recentemente, foram incluídos *Mycobacterium mungi* (TB em mamífero da família *Herpestidae*) (ALEXANDER et al. 2010) (Figura1-1) e *Mycobacterium*

orygis (TB em animais da família Bovidae, gênero *oryx*, tipo de antílopes, e em humanos na África e sul da Ásia) (Ingen et al 2012).



Figura 1-1 *Mungos mungo* da família Herpestidae, do qual isolou-se *M. mungi*. (ALEXANDER et al. 2010)

Entre outros complexos, além do CMTB, distinguem-se o Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) que agrupa as espécies *M. avium*, *M. hominissuis*, *M. silvaticum*, e *M. paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. colombiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. timonense*, *M. arosiense*, e *M. marseillense* (Cayrou et al. 2010), o Complexo *M. abscessus* contém *M. abscessus subsp. abscessus*, *M. abscessus subsp. massiliense* e *M. abscessus subsp. bolletii* (Lee et al 2015), o Complexo *Mycobacterium terrae* com as espécies *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium nonchromogenicum* e *Mycobacterium triviale* (BRASIL 2008).

As espécies do gênero *Mycobacterium* apresentam tamanho médio de 0,2 a 0,6 μm por 1 a 4 μm . Apresentam-se geralmente, como bastonetes finos, retos, ligeiramente encurvados ou em forma de clava. Podem, ainda, ocorrer na forma de cocobacilos curtos, filamentosos ou micelióides. São aeróbios, não possuem motilidade e não formam esporos. O cromossoma tem de 2,8 a 4,5 x 10⁹ pares de bases (CLARK-CURTISS 1990) e alto conteúdo das bases guanina e citosina (G+C = 66 a 72%) (BAESS & MANSA 1978). Não se coram bem pelo método de Gram, mas são considerados Gram positivos (HOLT et al. 1994). Coram-se por vários corantes básicos, mas não se descoram com a solução de álcool ácido. Isto ocorre pela presença de ácidos micólicos, que são lipídios que compõe a parede celular, impedindo a remoção do corante pelo álcool-ácido que os caracteriza como bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), permitindo sua identificação por microscopia direta (RATLEDGE & STANFORD 1983; BRASIL 2008) (Figura 1-2).

O aspecto morfológico das colônias é outra característica que pode ser usada como “screening” na identificação das espécies cultivadas. Podem ter aspectos variados tais como, colônias secas e rugosas, lisa-opaca e lisa-transparente.

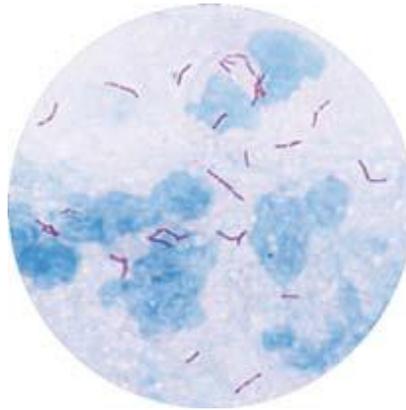


Figura 1-2 Característica microscópica dos bacilos álcool ácido resistente em esfregaço corado pelo método de Ziehl Neelsen
Fonte: BRASIL 2008

Em 1959, Timpe e Runyon introduziram como critério, para agrupar MNT, o tempo de crescimento “*in vitro*” e a produção de pigmento em presença ou ausência de luz. Desta forma, pode-se classificar as micobactérias em espécies de crescimento rápido (2 a 7 dias) e de crescimento lento (1 a 4 semanas). Quanto à produção de pigmentos, a maioria das espécies não é pigmentada ou apresenta tons variados de amarelo (Tabela 1) (RUNYON 1959; BRASIL 2008).

Tabela 1 Classificação de micobactérias não tuberculosas pelo critério de Runyon (1959).

Grupos	Pigmentação	Tempo de crescimento	Exemplo de Espécies
Grupo I	Fotocromógenas	Lento	<i>M.kansasii</i> , <i>M.marimum</i>
Grupo II	Escotocromógenas	Lento	<i>M. gordone</i> , <i>M.szulgai</i>
Grupo III	Acromógenas	Lento	<i>M.avium</i> , <i>M.terrae</i>
Grupo IV	Variável	Rápido	<i>M.fortuitum</i>

Fonte: Brasil 2008

Algumas espécies de crescimento rápido foram reunidas em grupos pelo critério tempo de crescimento: (i) grupo *M. fortuitum* composto pelas espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense* *M. bonickei*;

(ii) grupo *M. chelonae* pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum* e (iii) grupo *M. smegmatis*, pelas espécies *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. goodii* (BROUN-ELLIOTT & WALLACE 2002).

A parede celular das micobactérias, consiste de um complexo (mAGP) *mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan* (ROMBOUTS et al. 2012). A parede é responsável pela resistência inata aos antibióticos e desempenha um papel importante, para a sua virulência e viabilidade (CAREL et al. 2014). Possui em sua constituição química diversos lipídeos, entre eles os ácidos micólicos (AM) que são responsáveis pela morfologia do bacilo e utilizados em testes de identificação das espécies e subespécies de micobactérias (BRASIL 2008; GROENEWALD et al. 2014). É também na parede que se encontra o composto 6-6' dimicolato de trealose responsável pela película que *M. tuberculosis* forma em meio de cultivo líquido e pelo aspecto de corda do crescimento bacilar em esfregaços (BRASIL 2008). A estrutura do fator de corda (FC) foi completamente esclarecida por Noll et al em 1956.

A membrana citoplasmática (MC) é responsável pelo transporte e seleção de substâncias e pela síntese de pigmentos carotenóides e niacina, utilizados nos testes de identificação fenotípica (BRASIL 2008). Grânulos de polifosfato são utilizados em atividades energéticas e multiplicação celular e ribossomos, que possuem enzimas necessárias à biossíntese celular, entre elas a responsável pela redução do nitrato a nitrito, uma das provas utilizadas na identificação de *M. tuberculosis* (BRASIL 2008).

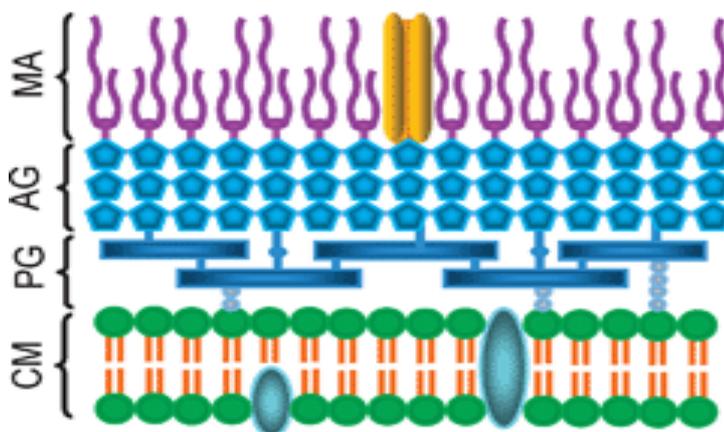


Figura 1-3 Representação esquemática da parede celular de *Mycobacterium*.

CM: membrana citoplasmática, PG: peptidoglicana, AG: arabinogalactana, MA: ácidos micólicos. Adaptado de Wu & Zhou (2009)

A genotipagem de *M. tuberculosis*, principalmente para identificação de surto, tornou-se um modelo no campo da epidemiologia molecular (BIFANI et al. 2000). Compreender a

diversidade de patógenos é importante, tanto por razões epidemiológicas, quanto biológicas (COMAS et al 2009). Em 1998, Cole et. al publicou a sequência completa do genoma da cepa do *M.tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), sendo o primeiro a ser sequenciado e utilizado extensivamente como referência nas análises filogenéticas (OKUMURA et al. 2015).

1.3 Epidemiologia

1.3.1 Epidemiologia da Tuberculose no mundo

Globalmente, a TB continua uma das doenças transmissíveis de maior mortalidade. *M. tuberculosis* (MTB) infecta cerca de 2 bilhões de pessoas e sua incidência tem aumentado devido a vários fatores, em particular, a infecção pelo *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (BRASIL 2011; WHO 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou aumento da TB de 2013 (9.0 milhões) para 2014 (9,6 milhões) e a elencou, em 2012, como a segunda principal causa de morte por uma doença infecciosa no mundo, depois do HIV, entretanto, em 2014, declarou que a mortalidade por TB equiparou-se ao HIV (WHO 2014; WHO 2015). Assim, cerca de 1,5 milhões de pessoas evoluíram para óbito nestes dois últimos períodos, dos quais, 1,1 milhões seriam HIV-negativos e 0,4 milhões HIV-positivos (WHO 2013; WHO 2014). Quanto ao gênero, foram diagnosticados com tuberculose cerca de 5,4 milhões de indivíduos do sexo masculino e 3,2 milhões do sexo feminino; os casos pediátricos foram estimados em 1,0 milhão de crianças (WHO 2013; WHO 2014; WHO 2015).

Tuberculose por cepas resistentes aos fármacos está estimada em 3,3% dos novos casos e em 20% dos casos MDR previamente tratados, dado este muito similar aos dos últimos anos (WHO 2015). Dos 480.000 casos de MDR-TB, que ocorreram em 2014, estima-se que apenas cerca de 123.000 foram detectadas e informados e 190.000 morreram de MDR-TB (WHO 2014; WHO 2015). Um total de 111.000 pessoas iniciaram o tratamento para cepas MDR-TB em 2014, um aumento cerca de 14% em comparação com 2013. Estima-se que 9,7% das pessoas com MDR-TB têm tuberculose extensivamente resistente a drogas (XDR-TB), porém, sem confirmação laboratorial (WHO 2015).

A maioria dos casos novos estaria em regiões da Ásia (55%) e da África (31%), enquanto as regiões do Mediterrâneo Oriental (6%), Europa (5%) e Américas (3%) teriam os menores percentuais (BRASIL 2011). Em todo o mundo, o diagnóstico precoce e tratamento adequado da TB salvou um número estimado de 43 milhões de vidas entre 2000 e 2014. Globalmente, a incidência de TB tem declinado, em média, de 1,5% ao ano desde 2000,

atingindo até o momento uma redução de 18%. Apesar destes avanços, e do fato de que quase todos os casos podem ser curados, a TB continua uma das maiores ameaças do mundo e o seu controle deve ser acelerado (WHO 2014; WHO 2015).

1.3.2 Epidemiologia da Tuberculose no Brasil

O Brasil faz parte do grupo dos 22 países que concentram 80% dos casos de TB no mundo com alta carga bacilar, ocupando a 16ª posição em número absoluto de casos (WHO 2014). Em 2014, foram notificados 81.512 casos dos quais 73.970 era virgem de tratamento e 7.542 previamente tratados. Observa-se redução do coeficiente de incidência, passando de 41,5/100 mil habitantes em 2005 para 33,5/100 mil habitantes em 2013, o que corresponde a uma redução média de 2,3% ao ano, nesse período (BRASIL 2015a; WHO 2015). Em 2014, os casos de TB pulmonar confirmados bacteriologicamente, foram em torno de 41.120 com 3.602 recidivas e 17.801 casos diagnosticados clinicamente com 1.488 recidivas (WHO 2015).

A OMS recomenda a cura de pelo menos 85 % dos casos de TB pulmonar bacilífera e espera-se abandono abaixo de 5% (WHO 2014), mas em 2013, apenas 72,5% tiveram desfecho por cura, embora taxas mais elevadas foram descritas em alguns estados da federação, tais como: Estados do Acre (87,3%), São Paulo (82,8%) e Paraná (79,2%) (BRASIL 2015a).

No ano de 2014, segundo dados preliminares do Ministério da Saúde, o estado do Amazonas e Rio de Janeiro apresentaram os coeficientes de incidência mais altos de TB, 66,7 e 61,1/100 mil habitantes, respectivamente. Enquanto que Goiás e Distrito Federal apresentaram as menores taxas, 13,1 e 13/100 mil habitantes, respectivamente. O estado do Piauí apresentou coeficiente de incidência de 19/100 mil habitantes, com taxa de cura de 74,2%, de abandono de 6,0% e mortalidade de 2,4% aquém do aceitável (BRASIL 2015b).

1.3.3 Tuberculose Extrapulmonar no Brasil

Embora os dados sejam limitados, a doença extrapulmonar (TBE) é uma apresentação comum da TB no Brasil. Em 2011, de todos os casos de TB notificados no Mundo pela OMS, 14% foram de TB Extrapulmonar (GOMES et al. 2014). No Brasil, em 2014, houve 9.479 casos novos e 480 recidivas (WHO 2015).

1.3.4 *Micobactérias Não Tuberculosas*

Até 1950, eram definidas como micobacterias atípicas ou anônimas, hoje convencionou-se chamá-las de micobacterias não tuberculose (MNT). As MNT são saprófitas de vida livre e ubíquo na natureza, sendo encontrada na água, solo, poeira, hortaliças e algumas são patógenos oportunistas.

A doença causada por MNT é genericamente designada micobacteriose, independentemente da espécie responsável pela patologia. Mais de 100 espécies de MNT são ubiquamente distribuídas no ambiente e algumas classificadas como potencialmente patogênicas (Tabela 2) (LEÃO 2004; BRASIL 2008; SHAO 2015).

Tabela 2 Lista de micobactérias não tuberculosas (MNT), classificadas de acordo com a patogenicidade.

MNT potencialmente patogênicas	MNT raramente patogênicas
<i>M. abscessus</i>	<i>M. agri</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. aurum</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. branderi</i>
<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	<i>M. chitae</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. duvalli</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. fallax</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. flavescens</i>
<i>M. genavense</i>	<i>M. gastri</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. gordonae</i>
<i>M. immunogenum</i>	<i>M. hassiacum</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. mageritense</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. neoaurum</i>
<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
<i>M. malmoense</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. porcinum</i>
<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. pulveris</i>
<i>M. peregrinum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. shimoidei</i>	<i>M. triviale</i>

Tabela 2 Lista de micobactérias não tuberculosas (MNT), classificadas de acordo com a patogenicidade. Continua.

<i>M. simiae</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. szulgai</i>	
<i>M. ulcerans</i>	
<i>M. xenopi</i>	

Fonte: Leão et al. (2004).

Nos países em desenvolvimento, as infecções por MNT podem ser ofuscadas pela alta incidência de TB. Mesmo nos países desenvolvidos, só tiveram sua incidência dramaticamente aumentada a partir da emergência de pacientes infectados pelo HIV (BENSI 2013). Entretanto, mesmo após a introdução das terapias antiretrovirais, que controla a carga viral dos pacientes com AIDS (acquired immune deficiency syndrome) o isolamento de MNT continuou a aumentar no mundo. Vários fatores são enumerados para explicar este aumento, entre os quais, maior exposição a aerossóis de fontes aquáticas ambientais, maior virulência associada a transferência genética (Complexo *Mycobacterium avium* - MAC, p.ex., é afetado por plasmídeos, enquanto isto não ocorre para *M. tuberculosis*), mudança climática, aquisição nosocomial (através das fontes de água, broncoscópicas, etc), mas talvez mais associado a melhorias nas técnicas laboratoriais de isolamento e identificação.

Espécimes clínicos infectados por MNT podem dar origem, nos exames bacterioscópicos, a resultados com BAAR positivos e resultados histopatológicos semelhantes aos encontrados em TB. No entanto, o tratamento e as implicações para a saúde pública da doença MNT são muito diferentes da doença causada por *M. tuberculosis*. Assim, a diferenciação rápida e a correta identificação do perfil de sensibilidade para *M. tuberculosis* é essencial para a escolha correta do esquema medicamentoso preconizados e do tipo de intervenção, especialmente, pacientes com coinfeção pelo HIV/AIDS (BRASIL 2008; SIMEÃO et al. 2009; BRASIL 2011). Para as MNT, o teste de susceptibilidade é apenas sugestivo, pois o resultado pode não representar a realidade, e a aplicação do esquema de tratamento deve ser criteriosa (BRASIL 2008; SIMEÃO et al. 2009).

Micobactérias de crescimento rápido, como *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* podem ser facilmente recuperadas a partir do solo e de fontes de águas naturais. Investigações de alguns surtos hospitalares sugerem que o ar, a água da torneira e água destilada (utilizadas para a preparação de soluções de diálise ou cirurgia) podem ser fontes de micobactérias

(JOHNSON & ODELL 2014). O microrganismo de crescimento lento *Mycobacterium kansasii* é difícil de ser recuperado do meio ambiente, mas foi isolado de água de torneira (CAMPOS 2006).

O isolamento de espécies de MNT responsáveis por doenças parece variar em relação a diferentes áreas geográficas (Tabela 3).

Tabela 3 Distribuição geográfica variável das espécies de MNT, associadas à doença, nos diferentes continentes.

Doença	Distribuição geográfica	Espécies comuns	Espécies incomuns
Pulmonar	Mundial	<i>M. abscessus</i> e <i>MAC</i>	<i>M. asiaticum</i>
	EUA, Europa, África do Sul	<i>M. kansasii</i>	<i>M. haemophilum</i>
Linfadenite	Mundial	<i>MAC</i> e <i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. kansasii</i> , <i>M. szulgai</i>
	Reino Unido e Escandinávia	<i>M. malmoense</i>	<i>M. abscessus</i>
Disseminada	Mundial	<i>MAC</i>	<i>M. abscessus</i>
	EUA e África do Sul	<i>M. kansasii</i>	<i>M. immunogenum</i>
Cutânea	Mundial	<i>M. marinum</i> e <i>M. abscessus</i>	<i>MAC</i>
	África, Ásia e Austrália	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. szulgai</i>

Fonte: Griffith *et al* (2007).

A utilização de metodologias como o sequenciamento do ácido desoxirribonucleico ribossomal 16S (16S-rDNA), a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), e a análise por reação em cadeia da polimerase do polimorfismo de reação de enzima de restrição (PRA), levaram ao aumento significativo de novas espécies de MNT, atualmente mais de 160 espécies são reconhecidas no gênero *Mycobacterium* (BROWN-ELLIOTT *et al.* 2002).

1.4 Patogênese e Infectologia

O estabelecimento da infecção pela micobactéria depende de seu encontro com a célula hospedeira, geralmente, o macrófago alveolar que os fagocita. Inicialmente os macrófagos não sensibilizados são incapazes de destruir os bacilos, havendo multiplicação intracelular com destruição destas células, liberação de enzimas lisossomais, destruição tecidual com reação inflamatória inespecífica que forma o granuloma. Com o aparecimento do fenômeno da hipersensibilidade (10 a 14 dias), ocorre uma forma peculiar de necrose no centro do granuloma, chamada de necrose caseosa (CROFTON, HORNE & MILLER, 1992; BROOKS et al. 1998; GILLESPIE et al. 2006).

Quando a resposta inflamatória inicial é pouco eficiente, bacilos podem alcançar os linfonodos do hilo pulmonar e provocar lesões idênticas àsquelas do pulmão. Quando o indivíduo possui as lesões pulmonares e ganglionar satélite, diz-se que ele apresenta o complexo de Ghon ou complexo primário da TB (primo-infecção). Alguns poucos bacilos podem alcançar órgãos distantes, permanecendo em estado latente e em determinado momento proliferar, causando lesões típicas da TB, mesmo na ausência de doença pulmonar ativa (TB extrapulmonar) (GUIRADO 2013; BRASIL 2011).

A TB secundária ou pós-primária se dá por reativação do foco primário (por queda da imunidade) ou por reinfecção exógena (o indivíduo entra uma vez mais em contato com o bacilo da TB). Com a evolução da infecção, há formação de novos granulomas e a necrose pode confluir, formando áreas de destruição pulmonar. Em casos favoráveis, ocorre a cicatrização da lesão e a cura do paciente (CROFTON, HORNE & MILLER, 1992; TORTORA & FUNKE 2003; MATHEMA et al. 2006).

Cerca de 90-95% dos indivíduos com TB latente não desenvolvem a doença clínica e 5-10% desenvolvem mais tarde na vida, devido à reativação da infecção original que é predominantemente uma doença pulmonar crônica de adultos, resultando em grandes danos nos pulmões e a transmissão eficiente de bactérias pelo ar (BRASIL 2011; ABEL 2014; COSCOLLA 2014).

A transmissão da TB depende de alguns fatores ambientais, que aumentam o tempo dos perdigotos suspensos no ar, tais como locais pequenos onde a circulação de ar é inadequada; ambientes hospitalares, aviões, presídios, etc; e fatores sociais tais como, contato com o caso índice doente que pode ser parente, amigo, contato eventual, etc. Portanto, para favorecer a diminuição de inalação de partículas infectadas presentes no ambiente, os locais bem ventilados e expostos à luz solar (radiação por luz ultravioleta e radiação gama) são os

menos propícios à disseminação da TB (SIGAUD 1989; BROOKS & BUTEL 1998; AIT-KHALED 2001; GILLESPIE & HAWKEY 2006).

Qualquer indivíduo com TB pulmonar multibacilar pode transmitir Mtb. Assim, quando a doença não é tratada, o doente pode infectar de 10 a 15 pessoas em um ano, disseminando a doença por eliminação de gotículas ou partículas (núcleo de Wells) de pequeno diâmetro (até 10 µm) contendo de 2 a 10 bacilos que são expelidas através da tosse, espirro e ato de falar. As gotículas quando eliminadas, ficam em suspensão no ar por várias horas, e ao serem inaladas pode chegar aos alvéolos pulmonares onde os bacilos se multiplicam. As gotículas maiores, com quantidades maiores de bacilos, não constituem fonte de infecção, porque logo se depositam no solo, não formando aerossóis e se forem inalados não conseguem chegar aos alvéolos, sendo carregadas para a orofaringe, deglutidas e eliminadas. Os bacilos depositados em mucosas intactas ou na pele não conseguem invadir o tecido. A estimativa para o risco de contágio para os contatos próximos aos pacientes é de 5 a 20% e nos casos de contato casual é de 0,2 a 2% (BATES et al. 1980; DUTT et al. 1989; KRITSKI et al. 2000; MATHEMA et al. 2006). O risco de transmissão em contactantes de pacientes paucibacilares não está esclarecido, entretanto, Behr et al (1999) mostraram por tipagem molecular pelo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que pacientes com BAAR negativo e cultura positiva eram responsáveis por 17% da transmissão da TB.

Os pacientes com TB paucibacilar são assim chamados, quando os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) não são visualizados no exame direto do espécime clínico por limitação da técnica de bacterioscopia. Os pacientes bacilíferos apresentam bacterioscopia positiva (BAAR +) quando estão eliminando ≥ 5000 bacilos/mL de espécime clínico. Já a cultura é mais sensível e pode ser positiva em pacientes eliminando 10 a 100 bacilos/mL de escarro (KATOCH 2004; BRASIL 2008).

Por outro lado, pouco se conhece da patogênese de MNT em humano. Não há nenhuma evidência de transmissão direta de MNT entre os seres humanos e, por não serem transmissíveis, não existe obrigatoriedade de notificação e o indicador de incidência no Brasil é desconhecido (BRASIL 2008; SHAO 2015). Também, não há evidências de transmissão de animais para o homem. Algumas espécies são encontradas na própria microbiota epidérmica e dos tratos respiratório e gastrointestinal dos seres humanos. Podem acometer qualquer tecido dos sistemas ou disseminar-se por todo o organismo, principalmente em pacientes imunocomprometidos (BRASIL 2008).

Os aerossóis podem ser um importante meio de transmissão da infecção, tanto na natureza como no ambiente doméstico (PARKER 1983) e, portanto a transmissão aérea pode ser uma via importante para as doenças respiratórias por MNT, enquanto que a ingestão de

MNT esteja associada às linfadenites em crianças e a doença disseminada em pacientes com AIDS, pois a infecção inicial ocorreria no trato gastro intestinal. Não é claro, se o quadro de doença por MNT iniciaria logo após a infecção ou após o estágio de infecção latente, como na TB. Nos casos de infecção por MNT dos tecidos moles a inoculação do microrganismo presente na água ou em outro material seria feita diretamente.

1.5 Diagnóstico

A detecção da doença em sua fase inicial é um trunfo importante no controle da TB pulmonar, pois possibilita a administração precoce do tratamento e conseqüente quebra da cadeia de transmissão. O diagnóstico clínico da TB é difícil, pois os sintomas podem ser confundidos com outras enfermidades e o diagnóstico radiológico só é útil em um estado mais avançado da doença. Aproximadamente 26,7% dos pacientes adultos no Brasil, são tratados sem confirmação para TB, com base apenas no quadro clínico-radiológico (CONDE et al. 2000; NAHID et al. 2006). Em pacientes com HIV, devido à apresentação clínica da sintomatologia para TB ser frequentemente não específica, o diagnóstico se torna mais complicado, o que pode retardar o tratamento e levar a letalidade (BARNES et al. 1991).

O teste tuberculínico cutâneo (TTC) (teste de Mantoux ou teste do PPD) tem sido usado para detecção da infecção desde os fins do século XIX, quando Robert Koch desenvolveu a “old tuberculin” que mais tarde derivou a solução antigênica PPD (derivado protéico purificado). O teste é realizado por inoculação intradérmica de 0,1mL /2UT (unidades de tuberculina) da PPD RT23, e a reação de hipersensibilidade tardia é observada após 48 ou 72 horas, sendo positivos ao teste, indivíduos que possuem uma reação ≥ 5 mm de diâmetro. Entretanto, devido a sua baixa sensibilidade e especificidade para indicar TB doença ou infecção, tem pouco valor diagnóstico (HUEBNER 1993; BATES & STEAD 1993). Reação PPD falso-negativa pode ser observada em alguns indivíduos com TB ativa, bem como em coinfectados HIV/Mtb (TOOSSI & ELLNER 1996). Por outro lado, reações PPD falso-positivas podem ocorrer devido à sensibilização por outras micobactérias, que compartilham os mesmos antígenos, e mais importante, o teste não distingue vacinados por BCG daqueles infectados por Mtb, sendo seu valor questionado nos indivíduos vacinados nos três anos anteriores à realização do teste (REICHMAN & HERSFIELD 1993; KRITSKI et al. 2000; RICHELDI 2006). Atualmente, o teste tem disponibilidade limitada e tende a ser descontinuado. A baciloscopia é o ensaio mais amplamente utilizado, porém, tem sensibilidade baixa (de 50% a 70%), principalmente para as formas clínicas paucibacilar

(THERON et al. 2014) e por não permitir a diferenciação entre CMTB e MNT. Quando executada de modo acurado permite detectar de 60% a 80% dos casos de TB pulmonar, o que é importante do ponto de vista epidemiológico, já que os casos bacilíferos são responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão (BRASIL 2008). A pesquisa bacteriológica é de importância fundamental em adultos, tanto para o diagnóstico quanto para o controle de tratamento (BRASIL 2008). A bacterioscopia convencional inclui o exame microscópico do espécime clínico em lâmina corado pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN), que utiliza a fucsina como corante. Embora a detecção bacterioscópica de BAAR seja um método simples, rápido e de baixo custo, possui também baixa especificidade já que não distingue *Mtb* de outros microrganismos álcool-ácido resistentes, tais como *Nocardia*, *Rhodococcus*, MNT e etc (BRASIL 2008; REICHMAN & HERSFIELD 1993).

A cultura é mais sensível (80 – 89%), permite a identificação da espécie por provas bioquímicas ou moleculares e a realização de teste de susceptibilidade aos micobacteriostáticos. Nos casos paucibacilares, com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% o diagnóstico microbiológico da doença (BRASIL 2008). A predominância de lipídios na parede celular da micobactérias requer meio de cultura específico para seu crescimento adequado. O meio de Löwenstein-Jensen (LJ) é mais utilizado nos países em desenvolvimento, e é feito a base de gemas de ovos (ricas em lipídios) contendo glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. A adição de piruvato de sódio como fonte de carbono, é recomendada para o isolamento de *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microti* (KEATING et al 2005). Os meios de Ogawa-Kudoh, Petragani, Middlebrook 7H10 e Middlebrook 7H11, são exemplos de outros meios sólidos utilizados no isolamento de micobactérias e têm a vantagem de serem de menor custo e apresentarem um índice de contaminação menor. A desvantagem é que a cultura é morosa (4 a 8 semanas) e laboriosa.

O meio líquido 7H9 de Middlebrook é bastante utilizado para o isolamento a partir de espécimes paucibacilares, inclusive sangue quando adicionado de substâncias anticoagulantes. É recomendado para repiques, conservação de amostras no freezer, preparação de inóculos padronizados e é o principal meio de cultura dos métodos automatizados.

O método em meio líquido radiométrico, com ¹⁴C-palmitato marcado como fonte exclusiva de carbono (BACTEC 460 TB - Becton Dickinson, Sparks, MD), foi usado por longo tempo e substituído pelas novas plataformas não radiométricas, completamente automatizadas, que detectam o crescimento bacteriano, como o MB/BacT (Biomérieux), BACTEC 9000 (Becton Dickinson), e o MGIT 960 (Becton Dickinson), MB REDOX (Heipha Diagnostika Biotest, Germany) e o sistema de cultura ESP II (Difco Laboratories,

Detroit, Mich), disponíveis comercialmente. Geralmente, estão presentes, em laboratórios de média a alta complexidade, para o diagnóstico de formas paucibacilares da TB e para teste de susceptibilidade as drogas, principalmente em serviços de referência de multirresistência ou que atenda pacientes coinfectados com o vírus HIV (BRASIL 2008; FEYZIOGLU et al. 2014). O BACTEC MGIT 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube) é um sistema automatizado que explora a fluorescência de um sensor de oxigênio para detectar o crescimento de micobactérias (HANNA et al. 1999), é mais utilizado em unidades de referência.

O diagnóstico utilizando o padrão ouro (cultura), além de não estar amplamente disponível na maioria dos países com elevada endemicidade, os resultados dos testes podem demorar até 3 meses e é laboriosa (PANTOJA et al. 2013). Assim, os métodos moleculares se constituem em importante ferramenta para auxiliar no diagnóstico da TB, já que fornece resultados em menor tempo e são menos laboriosos, embora necessitem de pessoal e infraestrutura adequada.

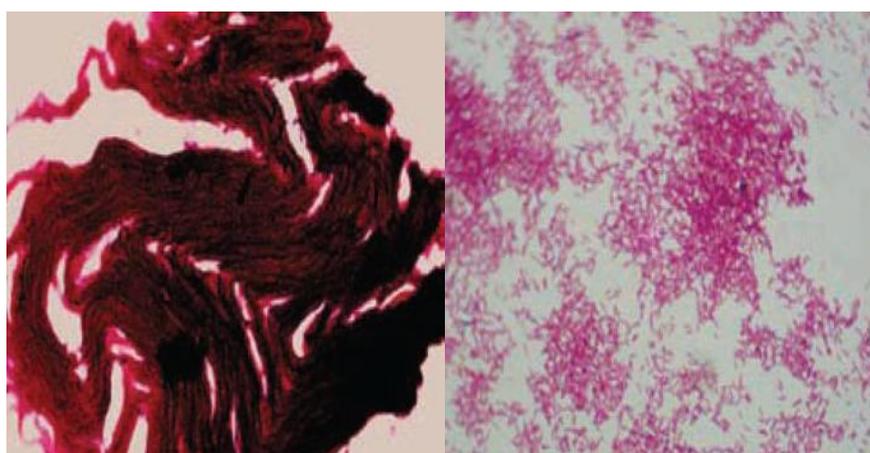
O desenvolvimento de testes moleculares integrados e automatizados simplifica o diagnóstico. O XpertMTB / RIF (Xpert, Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) é baseado na reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR-RT), onde é realizado a amplificação do DNA e detecção de sequências genéticas específicas de *M. tuberculosis* e indicativas da resistência à Rifampicina, isto é, detecta mutações do gene *rpoB* que está associado a resistência a este fármaco (BOEHME et al. 2010; WHO 2014b).

A plataforma automatizada GeneXpert, foi concluída em 2009, se constituindo em uma importante ferramenta na luta contra a TB, especialmente, por ser um teste molecular simples e robusto, além de proporcionar resultados diretamente do espécime clínico, escarro, em menos de 2 horas. Em outubro de 2013, a WHO emitiu recomendações do uso desta plataforma para diagnosticar TB pulmonar, TB infantil, TB extrapulmonar e a resistência a Rifampicina (WHO 2014b).

Embora a plataforma automatizada GeneXpert tenha trazido novo alento ao diagnóstico da TB, com resultados obtidos diretamente do espécime clínico, apresenta como desvantagens, o elevado custo, a necessidade de pessoal especializado, além de poder produzir resultados falso positivos para resistência a RIF e de não ser recomendado para monitorar o sucesso do tratamento, bem como falha ou recaída. Já o cultivo *in vitro*, permanece útil na rotina diagnóstica, pois neste, há a possibilidade de identificar também as micobacterioses por MNT. Portanto, quando associada a outras metodologias, apresenta excelente custo-benefício.

Dos métodos moleculares descritos baseados na amplificação de ácidos nucleicos (NAA) por reação em cadeia da polimerase (PCR) das amostras crescidas em culturas em meio sólido ou líquido, apenas os testes da Gen Probe (San Diego, CA, USA) e o Amplicor (Roche, USA) foram aprovados pelo FDA (Food Drug Administration, USA). O Gen-Probe MTD (*Mycobacterium tuberculosis* direct test) e o *enhanced* MTD test (E-MTD) são recomendados para espécimes respiratórios BAAR+ e para BAAR+/-, respectivamente. O sistema de sondas genéticas AccuProbe permite identificação de *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, MAC (distinguindo *M. avium* de *M. intracellulare*) e *M. goodii*, através de sondas DNA marcado por quimioluminescência que são complementares ao RNA ribossomal do organismo alvo. Embora não aprovados pelo FDA o sistema colorimétrico INNO-LIPA (immunogenetics, Ghent, Belgium), baseado na hibridização reversa entre 14 diferentes sondas aderidas a uma fita de membrana, reage especificamente com a região 16S-23S do RNA ribossomal de *M. tuberculosis* e doze outras MNT, simultaneamente. Entretanto, não distingue *M. abscessus* de *M. chelonae*; o mesmo ocorre com a versão alemã GenoType Mycobacteria CM e AS que detecta 19 MNT além de *M. mucogenicum* de crescimento rápido.

De maneira prática, para identificação e diferenciação entre os grupos CMTB e MNT, podem ser realizados quatro testes fenotípicos após crescimento em meio de cultura: análise microscópica da cultura, observando a formação de fator corda a partir de colônias coradas em esfregaço por Ziehl-Neelsen (Figura 1-4);



a) *M. tuberculosis* (aspecto corda) b) Micobactérias não tuberculosas

Figura 1-4 Aspecto de colônias micobacterianas, obtidas a partir de crescimento em culturas em meio sólido, em esfregaço corado por Ziehl Neelsen. a) Fator corda, b) bacilos álcool-ácido resistente. Fonte: Brasil 2008.

Na análise macroscópica da cultura, observa-se a presença ou ausência de pigmentação; inibição de crescimento, em meio de LJ contendo ácido para-nitrobenzóico (PNB), do grupo CMTB; e teste da Niacina, normalmente positivo para CMTB, especialmente *M. tuberculosis* e *M. africanum* (Tabela 4);

Tabela 4 Características fenotípicas para distinguir Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) das Micobactérias Não Tuberculosas (MNT).

TESTE	CMTB	MNT
Pigmentação	Ausente	presente/ausente
Formação de Fator Corda	+	-
Crescimento em LJ-PNB	-	+/-
Produção de Niacina	+/-	-/+

+/- = predominantemente positivo; -/+ = predominantemente negativo; LJ= Meio sólido de Löwenstein-Jensen; PNB = ácido p-nitrobenzóico. Fonte: BRASIL, 2008.

Adicionalmente, a diferenciação entre CMTB e MNT, também pode ser feita por métodos imunocromatográficos ou lateral “flow” tecnologia, que se baseia, na detecção de MPT64, um dos principais antígenos presentes no complexo *M. tuberculosis* (ABE et al. 1999; ANDERSEN et al. 1991; BRASIL 2008). O teste, que é produzido por diferentes laboratórios (Tuberculose Ag MPT64 Test Bioeasy; Nova Granada, Belo Horizonte-MG Brasil, Capilia MBP64 TB, Tauns Co. Ltd., Japan etc), é de fácil operacionalidade. Faz a identificação qualitativa rápida do antígeno MPT64 ou MBP64 do complexo *M. tuberculosis*, utilizando anticorpo monoclonal anti-MPT64 em colônias (e fluido de condensação) de cultura sólida e em crescimento em cultura líquida.

Na identificação de espécie de MNT o método tradicional de observação de pigmento, tempo de crescimento e reações bioquímicas são utilizados. Este último pode variar entre amostras da mesma espécie, e portanto, a identificação pode por vezes ser difícil. Assim, além dos métodos moleculares descritos acima, em 1993 foi descrito por Telente et al. um método molecular denominado PRA-PCR (*Polymerase Chain Reaction Restriction Enzyme Pattern Analysis do gene Heat Shock Protein* de 65 kDa). Este método se baseia na

amplificação parcial do gene *hsp65*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* ou iniciadores Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (5'-CTTGTC GAACCGCATAACCCT). Os produtos amplificados, de 439 pares de base, são digeridos com enzimas específicas (BstEII and HaeIII) gerando diferentes fragmentos que, de acordo com o tamanho, é associado a uma determinada espécie de MNT, através de um algoritmo construído de um compilado de perfis publicados (TELENTE et al. 1993; DEVALLOIS et al. 1997; CHIMARA et al. 2008). O gene de *hsp65* codifica uma proteína de choque térmico de 65 kDa estando presente em todas as micobactérias.

O sequenciamento do DNA ribossomal 16S (16S RNAr), entretanto, é o método de referência para a identificação de micobactérias. Esta molécula é altamente conservada, mas modificações em determinada posição de sua sequência é específico para diferentes espécies micobacterianas. Considerando a existência de um banco de dados onde estão depositadas as sequências gênicas de 16S RNAr das espécies conhecidas, torna-se possível a sua identificação.

Outros testes como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), é usado para diferenciação de lipídeos de espécies micobacterianas. Os ácidos micólicos são extraídos, identificados e quantificados por este processo. Os perfis obtidos são comparados a perfis de ác. micólicos existentes em uma biblioteca e aprovados pelo FDA. Entretanto, requer procedimentos tecnicamente complexos, laboriosos e caros, o que não favorece sua implantação em países com poucos recursos.

Na TB extrapulmonar onde a pleura é acometida, o exame bioquímico da enzima ADA (adenosina deaminase) é exaustivamente estudado. A ADA é uma enzima envolvida com o metabolismo das purinas e atua como catalisadora de conversão de adenosina e desoxiadenosina em inosina e desoxinosina, respectivamente. O teste, embora tenha a vantagem de ser rápido, de baixo custo e de fácil execução, apresenta variação de sensibilidade e especificidade em diferentes estudos, além de baixa sensibilidade em pacientes imunossuprimidos (CONDE et al. 2002, CHEN et al. 2004; LANIADO-LABORÍN et al. 2005). O teste é realizado no líquido pleural quantificando a enzima através de um método colorimétrico. A sensibilidade e especificidade do teste são elevadas em trabalhos oriundos de regiões de alta e baixa prevalência da doença, porém, como o teste não é padronizado, há discrepâncias entre os resultados (GOTO et al. 2003).

A meningite por *M. tuberculosis* é uma grave doença, que se não for diagnosticada e tratada precocemente, leva a uma alta taxa de mortalidade e de morbidade. Os métodos laboratoriais têm um papel importante no seu diagnóstico e no monitoramento da resposta terapêutica. O diagnóstico precoce da meningite TB é de difícil realização, pois a

bacterioscopia é pouco sensível, mas usualmente é estabelecido através da suspeita da história e dos sintomas clínicos, associados ao exame citoquímico do líquido cefalorraquiano (LCR). Entretanto, as alterações observadas não são patognomônicas, com apresentação clínica similar a outras meningites virais e bacterianas. Assim, a metodologia GeneXpert, é recomendada para o diagnóstico deste tipo de infecção, porém, existe limitações pela característica paucibacilar da amostra e limite de detecção do método (WHO 2014b).

Finalmente, é importante mencionar os principais critérios laboratoriais para se considerar o crescimento micobacteriano como agente etiológico, principalmente, para os casos suspeitos de MNT. Espécimes estéreis são líquido peritoneal, pericárdico, sinovial, pleural, liquor, gânglio linfático, sangue, medula óssea, biópsias ou espécime coletado por punção de locais fechados. A coleta deverá ser feita dentro dos princípios de assepsia para não comprometer a esterilidade do espécime na coleta. Nestes casos, uma baciloscopia e/ou cultura positiva tem valor diagnóstico. Em hemocultura inicial com resultado negativo, recomenda-se coletar uma segunda amostragem. Espécimes não estéreis são, escarro espontâneo e induzido, lavado bronco-alveolar, lavado brônquico, urina, secreção de lesões e biópsias do trato digestivo, do pulmão e de pele. Nestes casos, são necessárias, idealmente, três culturas positivas de espécimes coletados em dias distintos.

1.6 Sensibilidade a Tuberculostáticos

Os testes de sensibilidade (TS), são métodos laboratoriais de diagnóstico de resistência às drogas anti-TB classificados como fenotípicos ou genotípicos. São realizados após o crescimento em meio de cultura e após identificação das espécies como pertencentes ao CMTB (BRASIL 2008; LEMOS 2013).

Métodos fenotípicos baseiam-se no crescimento da micobactéria em meio de cultura com antimicrobianos adicionados ao meio. Os genotípicos são métodos moleculares de identificação da presença de mutações em genes que conferem resistência as drogas (LEMOS 2013; BRASIL 2008).

Entre os métodos clássicos ou convencionais tem-se o método das concentrações absolutas, método da razão de resistência e o método das proporções, que é o mais utilizado na maioria dos países da América Latina, incluindo o Brasil. O método das proporções em meio de cultura sólido (Löwenstein-Jensen - LJ), com drogas do tratamento básico incorporadas: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e estreptomina (SM) (BRASIL 2005; BRASIL 2008), apresenta eficiência de 97% e 99% para determinar a

atividade da INH e RIF, respectivamente, e ~92% para EMB e SM (BRASIL 2008). A grande desvantagem deste método é o tempo de realização do teste que pode estender-se por até 42 dias (BRASIL 2008). O meio líquido, usando o sistema BACTEC MGIT 960, reduz significativamente, o tempo envolvido na detecção de Mtb para duas semanas e depois, os resultados do teste de susceptibilidade são avaliados em até duas semanas (WHO 2008). Pode-se realizar o TS a partir de amostras semeadas em meio líquido com resultados positivos, ou a partir de inóculo de Mtb obtido em meio de cultivo sólido. A sensibilidade e especificidade do sistema MGIT 960, são 96% e 94,6%, respectivamente, e são semelhantes às encontradas com o método clássico das proporções (POTTATHIL 2011). A maior desvantagem da técnica em meio líquido é o seu elevado custo (WHO 2008).

Métodos genotípicos, também conhecidos como métodos moleculares, baseiam-se na detecção de mutações que conferem resistência aos fármacos como a INH, RIF, SM e EMB (YIH-YUAN CHEN et al. 2015; WHO 2009). Os testes moleculares mais comumente usados em todo o mundo são a GenoType MTBDRplus, o INNO-LiPA Rif.TB, e ensaios Xpert MTB/RIF. O MTBDRplus ensaio GenoType (Hain Lifescience) detecta mutações nos genes *katG/inhA* e *rpoB*, identificando resistência a INH e RIF, respectivamente. A sensibilidade e especificidade do método para a detecção de resistência à RIF são 98% e 99%, respectivamente, enquanto que para a detecção de resistência a INH, sensibilidade é de 85% e especificidade de 99% (WHO 2009). O Xpert MTB/RIF identifica resistência a RIF (mutação no gene *rpoB*), com sensibilidade e especificidade de 98 a 99% (WHO 2009; LEMOS 2013).

A utilização desses métodos para avaliar a sensibilidade de MNT não é recomendada, pois não há uma boa correlação entre os resultados *in vitro* e a resposta terapêutica do paciente, estando recomendada para algumas espécies, a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) da droga (BRASIL 2008).

1.7 Tratamento

A tuberculose é uma doença infecciosa curável, na maioria dos casos. O tratamento com esquema básico tem duração de seis meses, estendendo-se por mais tempo, nos casos resistentes. O esquema medicamentoso adequado, as doses corretas e o uso pelo tempo preconizado, são os princípios básicos para o sucesso do tratamento, além da estratégia do Tratamento Diretamente Observado (TDO) (BRASIL 2011). Portanto, a quimioterapia é a principal forma de controle da TB, por propiciar a interrupção da fonte de transmissão da doença que são os pacientes bacilíferos. Na administração do tratamento é necessário que os

fármacos sejam utilizados em esquemas terapêuticos padronizados e compostos de uma combinação de fármacos com ação sobre diferentes locais da lesão e das diferentes fases do metabolismo bacteriano, como prevenção de resistência. Alguns aspectos como a lenta multiplicação de Mtb, sua localização intracelular e atividade metabólica são fatores determinantes para o tratamento prolongado da TB. A população micobacteriana patogênica pode ser dividida em quatro: i) população com metabolismo ativo e crescimento rápido, em ambiente aeróbio; ii) população com metabolismo semi-dormente em ambiente intracelular ácido (lisossomo), onde ocorre baixa concentração de oxigênio; iii) população com metabolismo semi-dormente em ambiente intracelular não ácido (citoplasma) e iv) população com metabolismo extracelular dormente em que o bacilo tem a capacidade de sobreviver quiescente por anos ou décadas (BRASIL 2011; MITCHISON 1985; GILLESPIE 2002).

Após a descoberta das sulfonamidas durante as décadas de 30 e 40, vários fármacos foram testados para o tratamento da TB sem sucesso. Pela primeira vez em 1944, Waksman empregou a estreptomicina (SM) no tratamento da doença (SCHATZ & WAKSMAN 1944). Em 1949, entretanto, evidenciou-se que o tratamento com um único fármaco propiciava o aparecimento da resistência bacteriana.

Com a associação do ácido para amino-salicílico, no pós-Segunda Guerra Mundial, observou-se a redução na taxa de resistência a estreptomicina. Em 1952, com a introdução da INH, a TB tornou-se curável na maioria dos casos. No ano de 1965, a RIF foi reconhecida como um fármaco eficaz no tratamento da TB (ISEMAN 1994; BLANCHARD 1996; PELOQUIN 1997), seguido do etambutol, que continua a ser um fármaco de primeira linha, utilizado em combinação com a INH (PELOQUIN 1997).

A pirazinamida (PZA) cuja ação antituberculosa foi descrita em 1952, só passou a fazer parte do esquema quimioterápico de curta duração nos anos 80. É um fármaco de extraordinária atividade esterilizante, utilizada no esquema primário de tratamento. Possui atividade específica para o complexo Mtb e não é efetiva para outras micobactérias, incluindo *Mycobacterium bovis*. Quando utilizada em regimes terapêuticos, juntamente com a rifampicina, permite reduzir o tratamento para seis meses, devido a ação bactericida sobre os bacilos semi-dormentes (RATTAN et al. 1998; HEWLETT et al. 1995; ZHANG & MITCHISON 2003).

Os quadros infecciosos sensíveis, têm bons resultados de cura com o esquema de tratamento que consiste de uma fase de 2 meses de administração intensiva de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, seguido de quatro meses com INH e RIF (BRASIL 2011; FONSECA 2015).

Os casos com baciloscopia negativa e suspeita clínica ou radiológica de TB, devem ter cultura solicitada e encaminhados a um centro de referência.

O esquema terapêutico anti-TB deve atender a três grandes objetivos: ter atividade bactericida precoce; ser capaz de prevenir a emergência de bacilos resistentes; e ter atividade esterilizante. Após duas a três semanas, a maioria dos pacientes deixa de ser bacilífero (pacientes tratados pela primeira vez e sem riscos conhecidos de resistência).

O mecanismo pelo qual emerge a resistência micobacteriana em um indivíduo portador de TB é por meio da seleção de bacilos mutantes primariamente resistentes em uma população selvagem. Uma população micobacteriana tem diferentes proporções de bacilos com resistência natural a cada um dos tuberculostáticos (Tabela 5).

Tabela 5 Frequência de mutantes naturalmente resistentes na população de *M. tuberculosis* em relação aos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose:

Medicamento	Concentração em meio Löwestein-Jensen (µg/mL)	Resistência Natural
Rifampicina	40	1 mutante resistente a cada 10^{7-8} bacilos
Isoniazida	0,2	1 mutante resistente a cada 10^{5-6} bacilos
Etambutol	2	1 mutante resistente a cada 10^{5-6} bacilos
Estreptomicina	4	1 mutante resistente a cada 10^{5-6} bacilos
Etionamida	20	1 mutante resistente a cada 10^{3-6} bacilos
Pirazinamida	25	1 mutante a cada 10^{2-4} bacilos

Fonte: Adaptado de CANETTI, G. *WHO*, Geneve, v. 41, n. 1, p. 21-43, 1969.

A atividade esterilizante tem a capacidade de eliminar todos os bacilos de uma lesão, impedindo a recidiva após o tratamento. INH e RIF são os medicamentos de maior poder bactericida. RIF é o medicamento com maior poder esterilizante. PZA e SM são também bactericidas, contra algumas populações de bacilos (OMS 2006). PZA é ativa apenas em meio

ácido (intracelular ou no interior dos granulomas) e importante para esquemas de primeira e segunda linha (OMS 2006; BRASIL 2011). SM é bactericida contra os bacilos de multiplicação rápida localizados em lesões cavitárias pulmonares. O EMB é bacteriostático para prevenir a emergência de bacilos resistentes (TABELA 6) (OMS 2006).

Tabela 6 Síntese das características de *M. tuberculosis* e a ação medicamentosa.

Localização	Característica bacilar	Justificativa	Ação Medicamentosa		
Intracelular (macrófagos)	Crescimento Lento	pH ácido	RIF		
		Ação enzimática celular	PZA		
		Baixa oferta de oxigênio	INH EMB		
Lesão caseosa (fechada)	Crescimento intermitente	pH neutro ou pH ácido (necrose tecidual, acúmulo de CO ₂ e ácido láctico)	RIF INH PZA		
		Parede da cavidade Pulmonar	Crescimento geométrico	pH neutro	RIF
				Boa oferta de oxigênio	INH
		Presença de nutrientes	SM EMB		

Fonte: Brasil (2008)

O tratamento recomendado no Brasil, deve ser desenvolvido sob regime ambulatorial diretamente observado (TDO) e a hospitalização deve ocorrer em casos especiais como meningoencefalite tuberculosa; intolerância incontrolável aos medicamentos anti-TB em ambulatório; casos que não permitam tratamento em ambulatório; intercorrências clínicas e/ou cirúrgicas relacionadas ou não a TB que necessitem de tratamento e/ou procedimento em unidade hospitalar; e casos em situação de vulnerabilidade social como ausência de residência fixa ou grupos com maior possibilidade de abandono, especialmente, se for um caso de

retratamento, falência ou multirresistência. As orientações de biossegurança devem ser observadas (BRASIL 2011).

O Brasil em 1979 estabeleceu os seguintes esquemas de tratamento: Esquema I [2(RIF.INH.PZA)/4(RIF.INH)] para os casos novos; Esquema I reforçado [2(RIF.INH.PZA.EMB)/4(RIF.INH.EMB)] para retratamentos; Esquema II [2(RIF.INH.PZA/7(RIF.INH))] para a forma meningoencefálica; e Esquema III [3(SM.PZA.EMB.ET/9EMB.ET)] para falência (BRASIL 2011).

Em 2009, o sistema de tratamento da TB no Brasil foi revisto e introduzido o EMB como quarto fármaco na fase intensiva. Ocorreu a modificação quanto a apresentação farmacológica desse esquema para comprimidos de doses fixas com quatro medicamentos combinados, RIF, INH, PZA e EMB (BRASIL 2011) e redução do tempo do tratamento para o período de 6 meses, como preconizadas pela OMS (BRASIL 2011; ZHANG 2013). Foram extintos os Esquemas I reforçado e III. Para crianças, mantêm-se o mesmo esquema (BRASIL 2011). Existem esquemas preconizados, para os casos de falência de tratamento como o Esquema Padronizado para Multirresistência ou Esquemas Especiais individualizados que devem ser criteriosamente avaliados, após comprovada a resistência a medicamentos. A estreptomicina compõe alguns esquemas para casos de falência (BRASIL 2011).

Casos sem comprovação bacteriológica podem iniciar tratamento por diagnóstico de probabilidade, após criteriosa avaliação clínica. Após iniciado, o tratamento não deve ser interrompido ou neste caso, apenas após revisão clínica e laboratorial (LOPES 2006).

Cepas resistentes são uma ameaça, pois há risco de se propagarem em uma comunidade (WONG 2011; WHO 2010). Se os pacientes são adequadamente assistidos, o sucesso do tratamento de MDR-TB (resistente a INH e RIF) pode chegar a 60% (WHO 2010). As infecção por cepas XDR-TB tornaram-se uma ameaça crescente (SHAH 2007), pois além de ser MDR é resistente a qualquer das fluoroquinolonas e, pelo menos, a uma das três drogas injetáveis de segunda linha (como canamicina, amicacina, ou capreomicina) (WHO 2006).

1.8 Justificativa

A grave situação da tuberculose está ligada a fatores associados a pobreza e a infecção por HIV, principalmente. O controle insuficiente da tuberculose e o surgimento de focos de tuberculose multirresistente (MDR-TB) e extensivamente resistente (XDR-TB), apontam para a necessidade de medidas eficazes de saúde pública. Ao mesmo tempo, as micobactérias não tuberculosas (MNT), têm sido identificadas em quadros infecciosos em associação com HIV, principalmente, e a sua frequência ainda é desconhecida no Brasil, já que não é uma doença

de notificação compulsória. Tuberculose e outras micobacterioses são clinicamente indistinguíveis, mas de regimes terapêuticos diferentes. Atualmente, no cenário piauiense, destaca-se, através de ações do Ministério da Saúde, a utilização de metodologias como PCR em tempo real (Xpert/ MTB RIF), específico para *M. tuberculosis* e para detectar a mutação do gene *rpoB*. Destaca-se ainda, o uso de metodologia automatizada de cultura em meio líquido (BACTEC MGIT 960). Ambos os métodos, têm contribuído eficazmente no diagnóstico laboratorial precoce e, portanto, como importante ferramenta para auxiliar na interrupção da cadeia de transmissão da tuberculose.

Portanto, esta pesquisa trará contribuição para o fortalecimento das medidas de controle e prevenção destas doenças, através da obtenção de dados sobre a frequência de *M. tuberculosis* e de MNT em espécimes referenciados ao Laboratório Central de Saúde Pública Dr Costa Alvarenga, no estado do Piauí (LACEN-PI) e da análise de correlação entre os métodos de identificação e resistência às drogas de *M. tuberculosis*, utilizados no LACEN-PI.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estimar a frequência de infecção causada por Complexo *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas, a partir da confirmação laboratorial de isolados bacteriológicos de espécimes clínicos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Correlacionar os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com a identificação do agente etiológico como CMTB ou MNT;
2. Caracterizar o perfil de sensibilidade aos tuberculostáticos dos isolados CMTB;
3. Comparar os resultados das metodologias utilizadas na identificação dos isolados micobacterianos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo descritivo transversal sobre a frequência de infecções por micobactérias a partir da confirmação laboratorial de isolados bacteriológicos de espécimes clínicos. As informações foram obtidas a partir do banco de dados GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial), do Livro de Registros de Resultados do Laboratório de Tuberculose e do banco de dados do Siscel (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral) do LACEN-PI (Laboratório Central de Saúde Pública Dr Costa Alvarenga). Informações complementares foram obtidas do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) e SITETB (Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose).

Variáveis avaliadas a) demográficas: idade, sexo, município de residência; b) laboratoriais: baciloscopia, cultura, fator corda, PCR em tempo real, identificação, teste de sensibilidade, sorologia para HIV, contagem de CD4 e CD8; c) clínica: apresentação e encerramento do caso.

3.2 Descrição da área do estudo

O Estado do Piauí possui 224 municípios e está localizado em área do Nordeste brasileiro de aproximadamente 1.558.196 km² e 3.184.165 milhões de habitantes. Possui taxa de incidência de tuberculose de 15,4/100.000 habitantes em 2013 (Boletim Epidemiológico da Tuberculose vol. 44 n° 02, 2014). Os serviços públicos do estado, comumente realizam atendimento de pacientes de estados vizinhos como Maranhão e Pará.

3.3 Local do estudo

Laboratório Central de Saúde Pública Dr Costa Alvarenga no estado do Piauí (LACEN-PI), referência Estadual para realização de metodologias como identificação e teste de sensibilidade de micobactérias com crescimento em meios (Ogawa-Kudoh) semeados a partir de espécimes de escarro e provenientes de outras unidades laboratoriais, e realização de exames a partir de espécimes *in natura* pulmonares e extrapulmonares nos meios sólido LJ e líquido Middlebrook 7H9 (automatizado). No LACEN-PI, também foi realizado a PCR em

tempo real ou teste rápido molecular (Xpert/MTB RIF), de amostras de escarro oriundas de municípios fora da capital Teresina, do sistema prisional, serviços de saúde privados, e amostras extrapulmonares dos diversos serviços de saúde.

3.4 Período

O estudo abrange dados de resultados obtidos na rotina laboratorial entre janeiro de 2014 e março de 2015.

3.5 População

Foram incluídos todos os pacientes com diagnóstico de tuberculose ou outra micobacteriose, obtidos a partir de espécimes (pulmonares e extrapulmonares) referenciadas ao Laboratório Central de Saúde Pública Dr Costa Alvarenga, no estado do Piauí.

3.6 Instrumento da coleta de dados clínico-epidemiológico e laboratorial

A pesquisa foi iniciada após a aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos-CEP/FACIME Protocolo, tendo por referência as diretrizes da Norma 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os dados das análises dos resultados laboratoriais foram compilados a partir dos casos identificados no período e registrados na ficha de coleta de dados. Durante a transcrição, foi mantida a confidencialidade sobre os dados e identidade dos pacientes. As informações coletadas foram armazenadas e organizadas em planilha Excel 2007 e utilizado o programa Epi Info 7.1 para análise estatística.

O projeto de pesquisa, intitulado “Identificação de micobactérias e perfil de sensibilidade a tuberculostáticos no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Piauí no período entre janeiro de 2014 a março de 2015”, foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí, credenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – Conselho Nacional de Saúde (CNS) / Ministério da Saúde (MS) para análise quanto aos princípios éticos. Seguiram-se as normas da ética para estudos clínicos com seres humanos, de acordo com a norma nº 466/16 do CNS. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí em 12 de março de 2015, sob CAAE nº 39508814.9.0000.5209, parecer 990.812 (Anexo)

3.7 Métodos de Confirmação Diagnóstica

Os métodos convencionais ou manuais foram realizados de acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL 2008), do Ministério da Saúde, que é utilizado no Brasil pelos laboratórios de referência. Os métodos automatizados foram realizados conforme o manual de instruções do fabricante.

Foram utilizados os seguintes métodos conforme fluxograma (Figura 3-1):

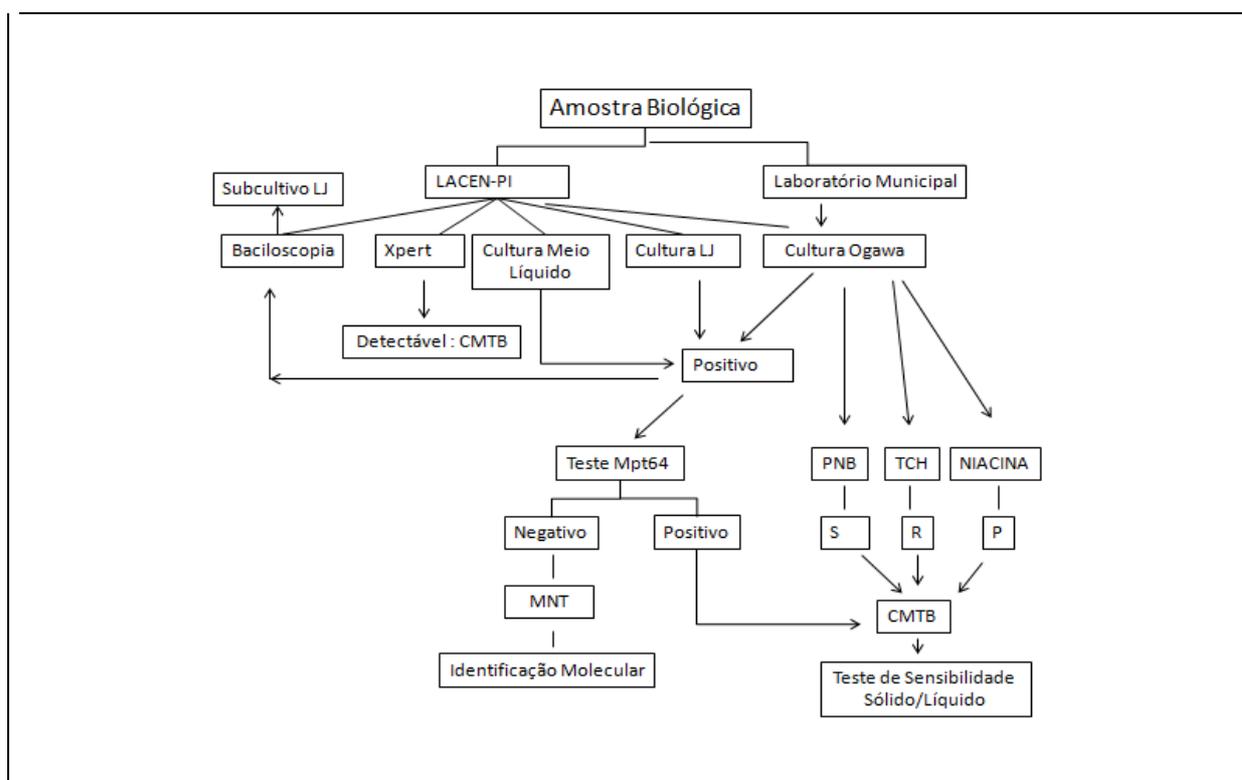


Figura 3-1 Fluxo de processamento de amostras rotineiramente usado na estratégia de identificação dos casos suspeitos de micobacterioses no LACEN-PI.

S= Sensível; R=Resistente; P=Positivo.

3.7.1 Baciloscopia

Foram preparados esfregaços em lâmina de vidro, com amostra fixada em chama e posteriormente, coberta com o corante fucsina. Aqueceu-se a parte inferior da lâmina em chama do bico de Bunsen, até a emissão de vapores. Após cinco minutos, lavou-se suavemente a lâmina com água corrente. O esfregaço foi coberto com solução álcool-ácido por 1 minuto. Lavou-se com água corrente e a lâmina foi coberta com azul de metileno por 2 minutos. Por último, realizada nova lavagem com água, a lâmina foi posicionada em pé para

secar e analisada em microscopia óptica com objetiva de imersão 100x (Figura 3-2). Os resultados da baciloscopia para espécimes clínicos (não escarro) são avaliados quanto a presença ou ausência de BAAR, e interpretados como positivos (independente da quantidade de bacilos) ou negativos, respectivamente. Os esfregaços preparados a partir de escarro foram expressos de acordo com a quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes presentes na lâmina, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008):

- não são encontrados BAAR/100 campos, relata-se o resultado como NEGATIVO;
- são encontrados de 1 a 9 BAAR/100 campos, relata-se apenas a quantidade de BAAR encontrada;
- são encontrados de 10 a 99 BAAR/ 100 campos, relata-se o resultado como POSITIVO +;
- se é encontrada em média de 1 a 10 BAAR/ campo, nos primeiros 50 campos observados, relata-se o resultado como POSITIVO ++;
- se é encontrada em média mais de 10 BAAR/ campo, nos primeiros 20 campos observados, relata-se o resultado como POSITIVO +++.



Figura 3-2 Fixação do esfregaço, lavagem da fucsina em água corrente e sentido de leitura lâmina. Fonte: (BRASIL 2008).

3.7.2 Cultura

Culturas em meio sólido - Ogawa-Kudoh e Löwestein-Jensen são meios sólidos enriquecidos à base de ovo. Utilizou-se o descontaminante NaOH (4%), para amostras de escarro espontâneo. Em seguida, semeou-se em meio Ogawa-Kudoh. As amostras extrapulmonares como LCR, originárias de sítios estéreis foram centrifugadas por 15 minutos a 3.000xg e semeadas em meio de LJ. Outras amostras foram descontaminadas pelo método Petroff modificado. Após o semeio, os tubos foram incubados em estufa entre 35 e 37° C para o crescimento das micobactérias. Em relação aos procedimentos de leituras semanais, foram realizados de acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e

outras Micobactérias (BRASIL 2008), onde registrou-se a leitura semanal no formulário “Registro de cultura em meio sólido e teste de sensibilidade” e no sistema de informação “GAL” com todas as observações, referentes a cada tubo de cultura como data da leitura, número de colônias visualizadas de acordo com a escala semiquantitativa, características morfológicas das colônias em relação à presença de pigmento, aspecto (lisa ou rugosa), e contaminação parcial ou total de cada tubo. Os critérios para leitura das culturas em meio sólido são apresentados na escala semiquantitativa abaixo:

- Menos de 20 colônias = Cultura Positiva (número de colônias).
- De 20 a 100 colônias = Cultura Positiva (+).
- Mais de 100 colônias separadas = Cultura Positiva (++)
- Colônias confluentes (tapete) = Cultura Positiva (+++).

Cultura em meio líquido - O sistema MGIT “Mycobacteria Growth Indicator Tube” (Becton & Dickinson) consiste em um meio líquido (Middlebrook 7H9), acrescido de antibióticos (PANTA - mistura de antibióticos) e suplemento OADC (ácido oleico, albumina bovina, dextrose, catalase), acondicionados em um tubo contendo um sensor fluorescente sensível ao oxigênio, composto de rutênio pentahidratado em uma base de silicone. Baseia-se na detecção da fluorescência na fase inicial da multiplicação micobacteriana no tubo indicador de crescimento micobacteriano (BBL). Processa-se neste método espécimes clínicos (exceto urina) e fluidos corporais estéreis (exceto sangue). Adiciona-se ao tubo, 0,8 mL do suplemento e em seguida 0,5mL da amostra (previamente descontaminada, se escarro). Os tubos inoculados são acondicionados em bandejas de incubação e colocados no equipamento de acordo com o manual BACTEC MGIT (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA).



Figura 3-3 Equipamento automatizado para cultivo de micobactérias em meio de cultura líquida, método BACTEC MGIT 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube).

Fonte: <http://www.bd.com/ds/productCenter/MT-BactecMgit960.asp>

3.7.4 Identificação

Os seguintes métodos foram utilizados, para identificação dos grupos e espécies:

Identificação morfológica - As culturas foram checadas, quanto ao crescimento macroscópico de colônias a cada sete dias, pelo prazo máximo de oito semanas. Foram registrados tempo de crescimento, pigmentação, morfologia e presença do fator corda em esfregaço corado pelo Ziehl-Neelsen e normalmente presente para CMTB.

Identificação bioquímica - Foram realizados os seguintes testes bioquímicos, utilizando o MTBAC (kit para identificação de micobactérias – Probac do Brasil), conforme a especificação do fabricante. Este kit contém ácido paranitrobenzóico (PNB), hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH), niacina, nitrato (PROBAC, 2008). Critério de interpretação:

- *Resistência ao ácido paranitrobenzóico (PNB)* – esta droga colabora para separar o complexo *M. tuberculosis* (sensível) das outras micobactérias.
- *Resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH)* – *M. tuberculosis* é a única espécie dentro do complexo a apresentar resistência a esta droga. Outras espécies podem apresentar resistência variável ao TCH.
- *Produção de niacina (ácido nicotínico)* – *M. tuberculosis* é uma das poucas espécies deste gênero capaz de liberar esta substância em quantidade detectável em meio de cultura.

Identificação imunocromatográfica - utilizou-se para identificação rápida do complexo *M. tuberculosis* em cultura sólida e líquida. Em cultura em meio líquido, foram utilizados 100µl de amostra e aplicada diretamente à cavidade do dispositivo sem prévia preparação. Em cultura em meio sólido, houve a preparação da amostra, utilizando-se 3 a 4 colônias que foram suspensas em 100µl de tampão de extração incluso no teste. Adicionou-se 100µl de cultura líquida ou os 100µl da suspensão de crescimento em tampão de extração na cavidade do dispositivo do teste. Interpretou-se o resultado do teste em até 15 minutos, positivo, quando aparecem duas linhas coloridas na janela de resultados, a linha controle “C” e a linha teste “T” (TB Ag MPT64 TEST BIOEASY).

Identificação Molecular

- *Teste Molecular (GeneXpert)* - Em amostra de escarro, utilizou-se 1 mL da amostra e 2 mL da solução reagente em tubo cônico virgem (proporção 1:2). Em amostra de LCR, utilizou-se a (proporção 1:1) da amostra e reagente. Ambos foram agitados em vórtex e transferidos 2 mL da preparação para o cartucho do kit e inserido em módulo do equipamento Xpert MTB/RIF. Para linfonodos e outros tecidos, fragmentou-se o espécime em um recipiente estéril. Adicionou-se 2 mL de tampão fosfato (PBS). Macerou-se o tecido com PBS usando um pistilo até obtenção de uma suspensão homogênea, que foi transferida para um tubo rosqueado cônico estéril no volume de 0,7 mL, adicionou-se o dobro de Solução de Reagente (1,4 mL). Agitou-se o tubo em vórtex (10 seg) e incubou-se por 10 min à temperatura ambiente. Agitou-se, e após repouso de 5 min, transferiu-se 2 mL ao cartucho para início do teste. A plataforma automatizada Xpert identifica os espécimes infectados por *M. tuberculosis* e sua resistência a rifampicina pelo ensaio de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT, nucleic acid amplification test). O sistema combina a preparação da amostra em cartuchos, a amplificação e detecção de ácido nucléico em um instrumento totalmente integrado e automatizado para a análise com resultados em 2 horas (Xpert, Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA). Segue abaixo demonstração da preparação do teste (Figura 3-4).



Figura 3-4 Preparação da amostra e inserção do cartucho em módulo do equipamento Xpert /RIF MTB PCR-RT (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA).

Fonte: <http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/diversos/XPert%20Word%2022Fev2012.pdf>

- *Testes Moleculares para identificação de micobactérias não tuberculosas* – resumando, os isolados de MNT de escarro, após obtenção de crescimento a partir da semente da segunda

amostra (escarro) e amostra única (extrapulmonares) são identificados por várias metodologias: o sequenciamento do DNAr-16S, a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), e por PRA-PCR, que são realizados no Laboratório de Referência Nacional (Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ FIOCRUZ).

3.7.4 Testes de susceptibilidade

Método das proporções (teste indireto) – Foi realizado de acordo com Canetti, Rist & Grosset (1963), em meio sólido de Löwenstein-Jensen adicionado dos fármacos nas concentrações mínima inibitórias sumarizadas na Tabela 7. Fluxograma do procedimento técnico está mostrado na Figura 3-5. Todos os procedimentos foram realizados em cabine de biossegurança (CBS).

Tabela 7 Características dos fármacos para o preparo do teste de susceptibilidade pelo método das proporções em meio sólido de Löwenstein-Jensen.

Fármaco	Concentração crítica micrograma / ml	Proporção crítica	pH do meio
SM	4,0	10,0%	6.8 - 7.0
INH	0,2	1,0%	6.8 - 7.0
EMB	40,0	1,0%	6.8 - 7.0
RIF	2,0	1,0%	6.8 - 7.0

Fonte: Adaptado de BRASIL (2008).

As leituras foram realizadas em 28 dias de incubação (primeira leitura) ou aguardou-se a segunda leitura ao final de 42 dias para liberação do resultado como sensível. Para facilitar a operacionalização da realização do TS no laboratório foram incluídas outras duas drogas para identificação de micobactérias, que não são utilizadas no tratamento (ácido p-nitrobenzóico – PNB e Hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico – TCH) (Brasil 2008).

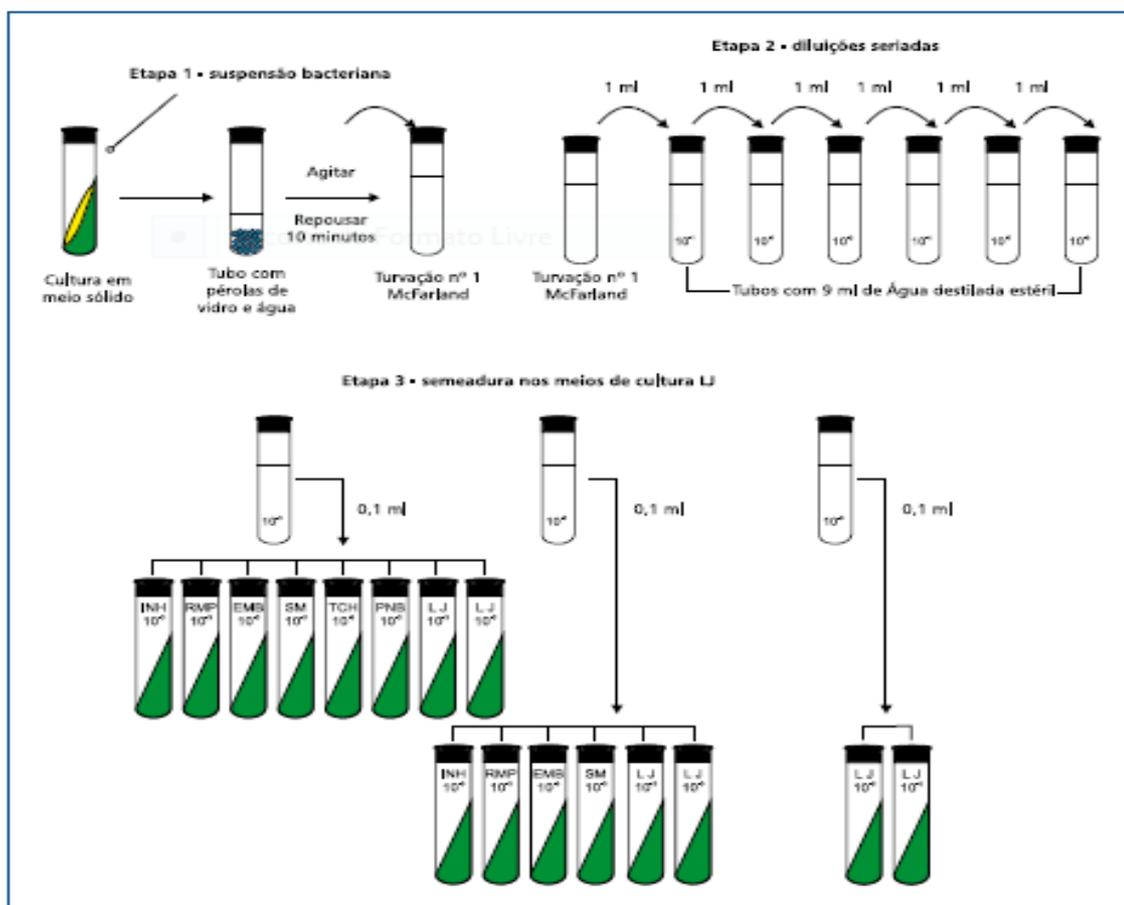


Figura 3-5 Fluxograma da realização do método das Proporções em meio Löwenstein-Jensen (técnica indireta) (BRASIL 2008).

Teste de sensibilidade automatizado MGIT- Avaliou-se a sensibilidade dos isolados micobacterianos às drogas SM, INH, RIF e EMB, nas concentrações finais 1,0 μ /mL, 0,1 μ /mL, 1,0 μ /mL e 5,0 μ /mL, respectivamente. Adicionou-se a cada um dos quatro tubos a serem testados para as quatro drogas, 800 μ L da droga reconstituída. Adicionou-se o 500 μ L inóculo, preparado de acordo com a Figuras 3-6 e 3-7, e de acordo com manual de procedimentos MGIT 960 (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA). A avaliação da susceptibilidade às drogas de segunda linha (ofloxacina, amicanica, kanamicina e capreomicina), ocorreu quando identificado resistência a alguma droga de primeira linha. A identificação da resistência a fármacos de segunda linha foi realizada no laboratório de referência nacional (Centro de Referência Professor Hélio Fraga/FIOCRUZ).

Teste de susceptibilidade à pirazinamida - resumando, o teste de susceptibilidade à pirazinamida não é rotineiramente realizado na maioria dos laboratórios, mas neste estudo, foi

realizado em 4 amostras com perfil de resistência a drogas de primeira ou segunda linha pelo método das proporções, no Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/ FIOCRUZ. Foi realizado no sistema BACTEC MGIT 960, utilizando o Kit comercial da Becton e Dickinson (BD), BACTEC MGIT 960 PZA Medium Susceptibility Test Medium e a suspensão bacteriana para inóculo foi preparada como descrito (Figura 3-6). Foram utilizados para cada teste de sensibilidade à PZA dois tubos de meio de cultura identificados, um tubo CC (Controle de Crescimento) e um tubo Z. Em ambos foi adicionado 0.8 mL de Suplemento BACTEC MGIT PZA. No tubo Z, foram adicionados 100 µL da solução 8000 µg/ml do fármaco MGIT PZA para que a concentração final de Z no tubo de MGIT 960 PZA fique em 100 µg/mL. Em seguida, 0,5 ml do inóculo padronizado foi incorporado. No tubo CC foi depositado 0,5 ml do inóculo padronizado diluído 1:10. Em seguida, após a homogeneização dos tubos por inversão, três a quatro vezes, os tubos foram levados ao sistema BACTEC MGIT 960 certificando-se da posição correta dos tubos no equipamento. O tubo CC foi posicionado em primeiro lugar na estante e o tubo adicionado de Z em segundo lugar.

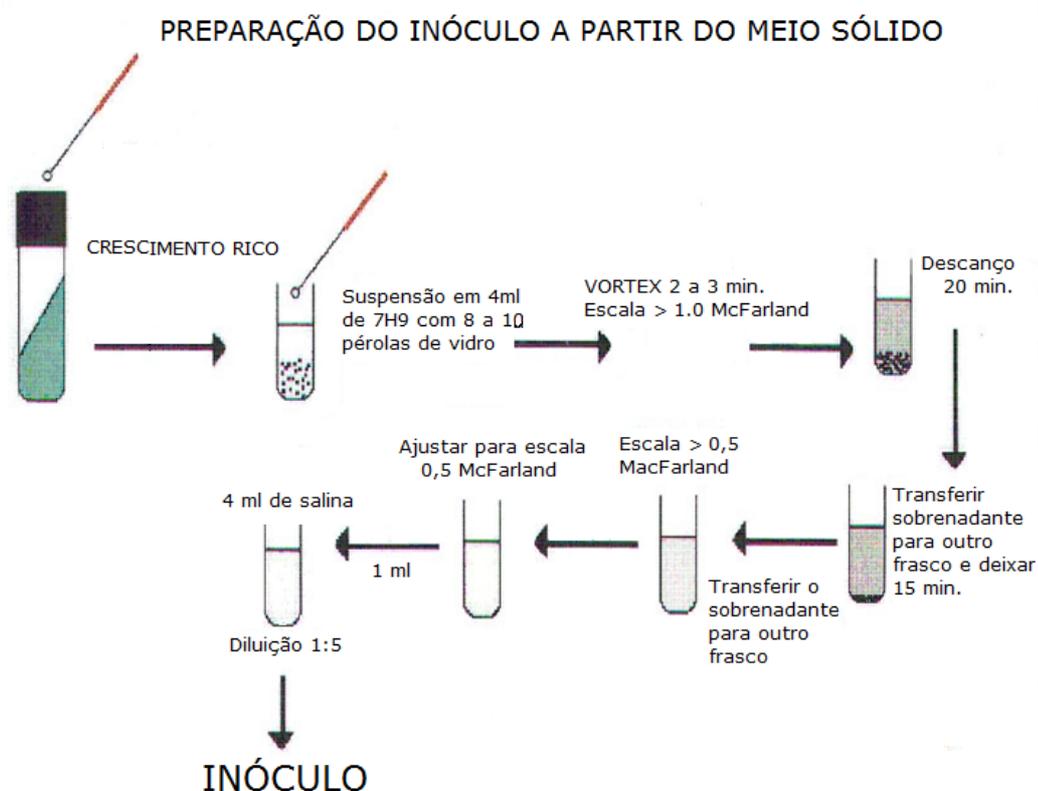


Figura 3-6 Preparo do inóculo para realização do teste de sensibilidade, a partir de crescimento colonial em meio sólido, em BACTEC MGIT 960

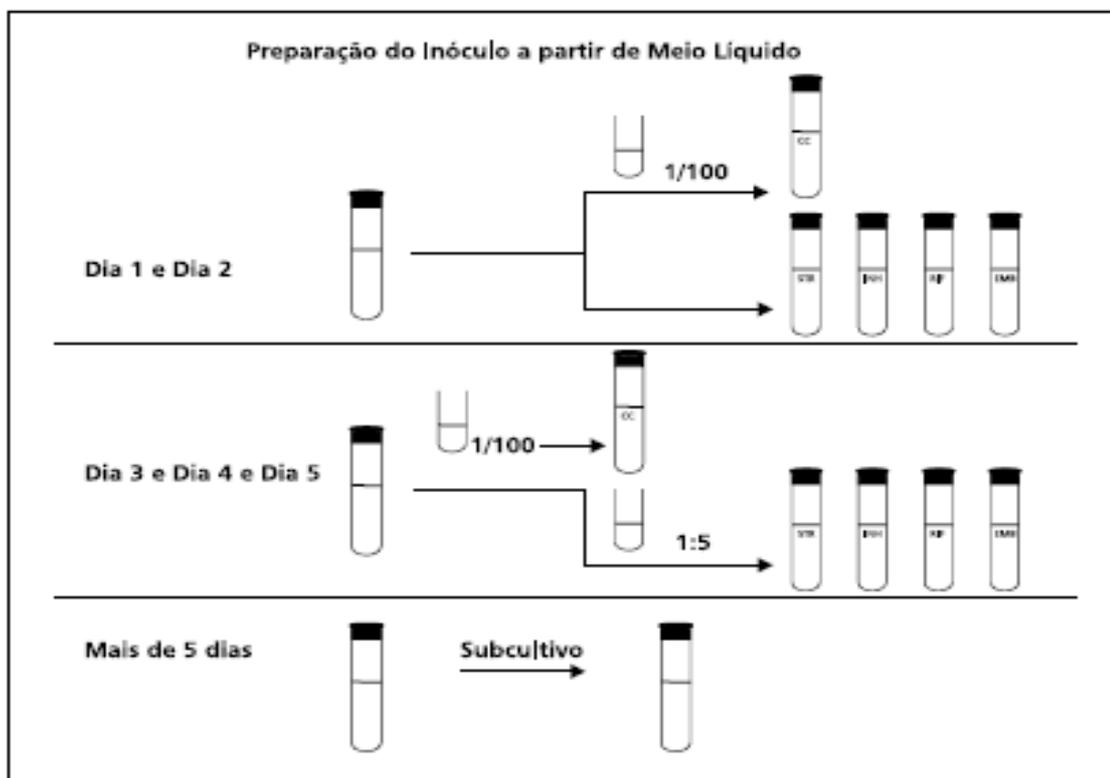


Figura 3-7 Preparo do inóculo para realização do teste de sensibilidade a partir de meio líquido em BACTEC MGIT 960 (BRASIL 2008).

3.8 Análise Estatística

Para se verificar associação estatística entre variáveis aleatórias discretas foram utilizados o Teste de Associação do Qui-quadrado e para frequências esperadas menores que cinco foi utilizado o Teste Exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95% e significância em $p < 0,05$. As estimativas de risco foram calculadas a partir do Qui-quadrado. Para avaliação de concordância entre técnicas, utilizou-se o teste *kappa*.

4 RESULTADOS

4.1 Casuística

No período de janeiro de 2014 a março de 2015, foram diagnosticados 142 pacientes albergando infecção por micobactérias no Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí. Foram referenciados ao LACEN-PI neste período, 706 amostras suspeitas de infecção, das quais, 142 (20,1%) tiveram testes positivos. Foram identificados pacientes originários de 22 cidades do Piauí, 8 cidades do Maranhão e 01 do Pará. A maioria dos pacientes (74/142; 52,1%) era proveniente da cidade de Teresina, seguida de Parnaíba (21; 14,8%), PI. Um total de 10 pacientes eram moradores de estados vizinhos, 9 (6,3%) do estado do Maranhão e 1 (0,7%) paciente do Pará (Tabela 8).

Tabela 8 Distribuição dos casos de tuberculose e micobacterioses por município, referenciados ao LACEN-PI, no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

Municípios	Número de pacientes	%
ALTO LONGA	1	0,7
ALTOS	2	1,4
BOM JESUS	1	0,7
CABECEIRAS DO PIAUI	2	1,4
CAMPO MAIOR	3	2,1
CANTO DO BURITI	2	1,4
CARACOL	1	0,7
CAXIAS-MA	1	0,7
CODO-MA	2	1,4
COELHO NETO-MA	1	0,7
COIVARAS	1	0,7
CRISTINO CASTRO	1	0,7
ESPERANTINA	4	2,8
FLORIANO	1	0,7
ITAUEIRA	1	0,7
LUIS CORREIA	1	0,7
MARABÁ-PA	1	0,7
MASSAPE DO PIAUI	2	1,4
MIGUEL ALVES	1	0,7
OEIRAS	1	0,7
PARNAIBA	21	14,8
PEDREIRAS-MA	1	0,7
PEDRO II	1	0,7

Tabela 8 Distribuição dos casos de tuberculose e micobacterioses por município, referenciados ao LACEN-PI, no período de janeiro de 2014 a março de 2015. Continua

PENITENCIÁRIA	1	0,7
ESPERANTINA	1	0,7
PICOS	1	0,7
PIRIPIRI	1	0,7
PRESIDENTE DUTRA-MA	1	0,7
SÃO MATEUS DO MARANHÃO	1	0,7
SÃO RAIMUNDO NONATO	1	0,7
TERESINA	74	52,1
TIMON-MA	3	2,1
TUTÓIA-MA	1	0,7
UNIÃO	3	2,1
URUÇUI	2	1,4

Dados em N (%), frequência absoluta (frequência relativa)

A forma pulmonar foi a forma clínica mais encontrada (128/142; 90,1%), seguida da meningocócica (9; 6,4%), ganglionar (1; 0,7%) e outras formas (4; 2,8%). A maioria dos pacientes apresenta faixa de idade entre 25 - 50 anos, mas foram diagnosticados pacientes de 1 a 94 anos (Figura 4-1), e a maioria era do sexo masculino (90; 63,4%).

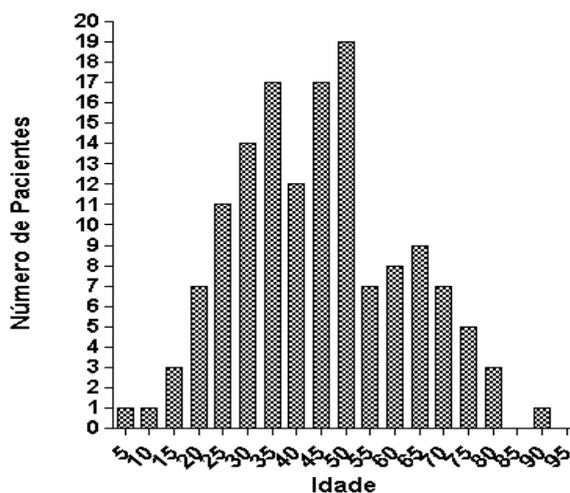


Figura 4-1 Distribuição, de acordo com a idade, dos 142 pacientes diagnosticados com infecção por micobactérias, e cujos espécimes clínicos foram referenciados no Laboratório Central de Saúde Pública Dr Costa Alvarenga no estado do Piauí (LACEN-PI) no período de janeiro de 2014 e março de 2015.

Os pacientes estavam, em sua maioria, infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (99/142; 69,7 %), enquanto 9,9 % (14/142) foram identificados infectados por MNT. As espécies de MNT identificadas foram: *Mycobacterium asiaticum* (1; 0,7%); *Mycobacterium szulgai* (1; 0,7%); *Mycobacterium abscessus* (5; 3,5%); *Mycobacterium avium* (2; 1,4%); *Mycobacterium intracelullare* (2; 1,4%); *Mycobacterium kansasii* (1; 0,7%); *Mycobacterium sp* (2; 1,4%). Um total de 20,54% dos pacientes com suspeita de infecção por micobacterias (SMNT) não tiveram as espécies identificadas (Figura 4-2).

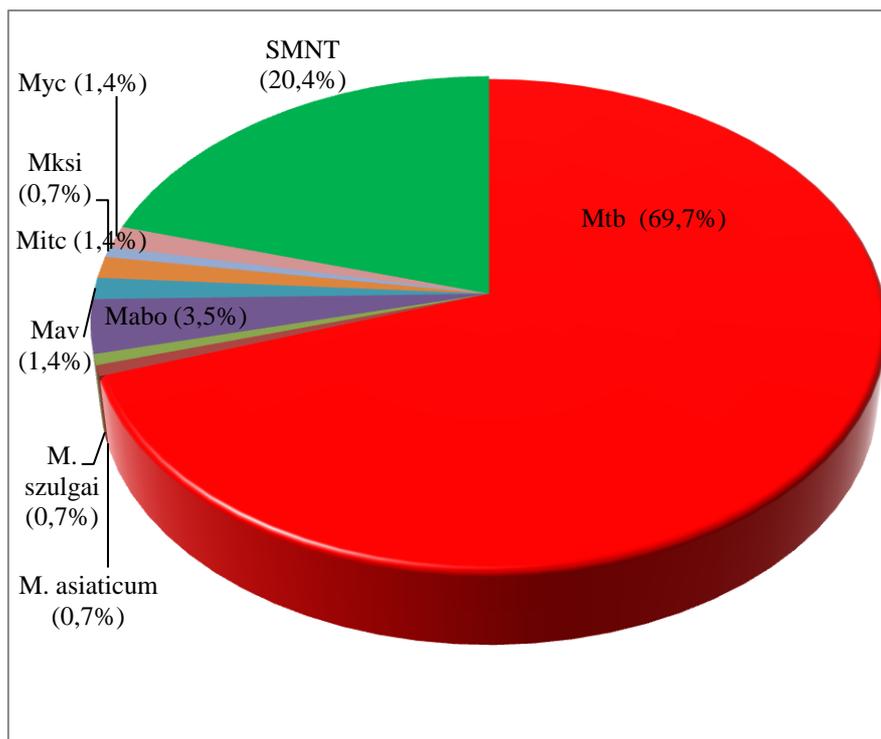


Figura 4-2 Frequência de espécies micobacterianas isoladas de 142 pacientes referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*; Mav: *Mycobacterium avium*; Mksi: *Mycobacterium kansasii*; Mabo: *Mycobacterium abscessus*; Mitc: *Mycobacterium intracelullare*; Myc: *Mycobacterium sp*. SMNT: suspeita de micobacterias não tuberculose.

Considerando apenas os pacientes infectados com MNT, ou suspeitos, de acordo com o estado de origem 12/139 (9,1%) é do estado do Piauí e 2/9 (22,2%) do estado do Maranhão.

Foi observado que 39/142 (27,5%) pacientes tinham status sorológico para HIV conhecido, dos quais 20 (51,3%) com resultado positivo e taxa média de células CD4 de 164 ± 223 células/mm³, com variação de 0 a 660 células/mm³. A coinfeção TB/HIV foi de 48,7%

(19/39) e MNT/HIV foi de 2,6 % (1/39), cuja cepa isolada foi identificada *M. abscessus*, e o paciente era da cidade de Teresina (PI). Esta espécie de MNT foi também isolada de um paciente HIV negativo residente em Parnaíba (PI).

Entre os pacientes que albergavam *Mycobacterium tuberculosis*, a média de idade foi significativamente menor ($39,3 \pm 14,9$ anos) que entre os infectados por MNT ($56,7 \pm 9,6$ anos) e o grupo com suspeita de MNT ou SMNT ($57,6 \pm 17,6$ anos, $p < 0,001$); (Figura 4-3).

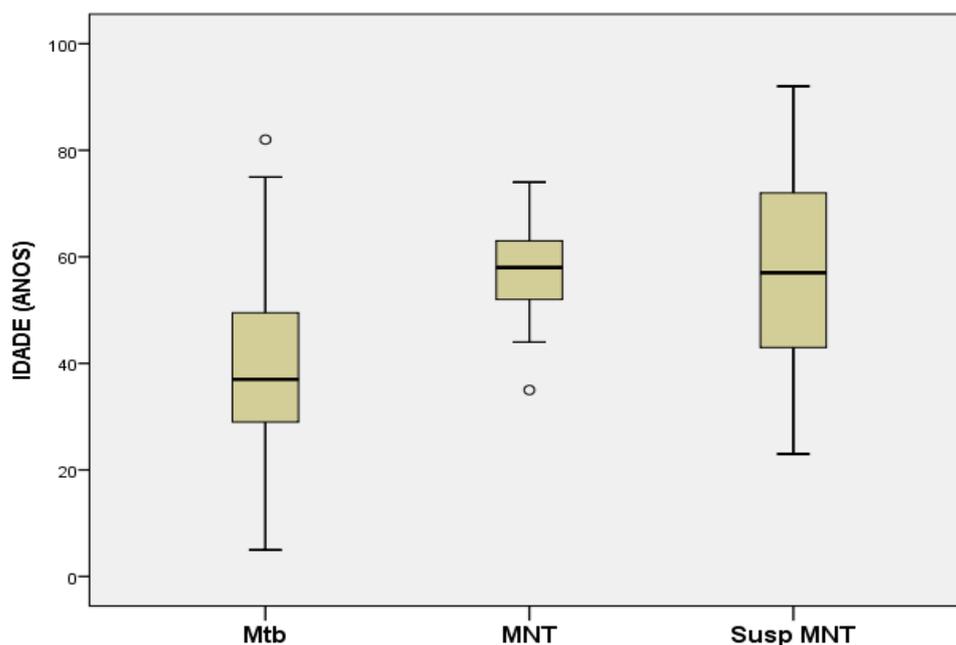


Figura 4-3 Média de idade, e desvio padrão, entre os pacientes diagnosticados com infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), por Micobactérias não tuberculosas (MNT) e no grupo com suspeita de MNT referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015. (* teste t de student, $p < 0,001$)

Entre os casos estudados, a proporção de pacientes do sexo masculino identificados com Mtb (68,7%) e MNT (64,3%) foi semelhante, porém, diferença significativa foi encontrada entre os pacientes masculinos com tuberculose ($p = 0,0395$) (Tabela 9).

Tabela 9 Distribuição, quanto ao sexo, dos 142 pacientes identificados com infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), por outras micobacterioses não tuberculose (MNT) e com suspeita de infecção por MNT, referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

Diagnóstico	SEXO		Total
	Feminino	Masculino	
Mtb	31 (31,3%)	68 (68,7%)*	99
MNT	5 (35,7%)	9 (64,3%)	14
SMNT	16 (55,2%)	13 (44,8%)	29
Total	52	90	142

* X^2 Yates corrected, $p=0,0395$

Quando os pacientes infectados por *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias não tuberculosas foram analisados quanto ao sítio de isolamento, evidenciou-se que os espécimes pulmonares foram majoritários para todas as espécies identificadas (64,7%), exceto 7,7%, cujo local de isolamento foi o líquido cefaloraquidiano (liquor ou LCR) e de outra origem extrapulmonar (Tabela 10).

Tabela 10 Distribuição, de acordo com o espécime clínico enviado para diagnóstico, de 142 pacientes identificados com infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), por outras micobacterioses não tuberculosas (MNT) e com suspeita de infecção por MNT (SMNT), referenciados no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

Diagnóstico	MATERIAL			TOTAL
	Pulmonar	Líquor	Outros sítios	
Mtb	89 (89,9%)	5 (5,1%)	5 (5,1%)	99
MNT	13 (92,9%)	1 (7,1%)	-	14
SMNT	26 (89,7%)	3 (10,3%)	-	29
Total	128	9	5	142

* X^2 Yates corrected, $p=0,84$

Dos testes convencionais utilizados na rotina diagnóstica para micobactérias, nos 142 espécimes referenciados ao LACEN-PI, a bacterioscopia produziu 90 (63,4%) espécimes BAAR positivos, dos quais 67 foram identificados como *M. tuberculosis*, 10 como MNT e 13 eram SMNT. A cultura produziu 122 (85,9%) espécimes com crescimento *in vitro*, dos quais 84 eram *M. tuberculosis*, 12 MNT e 26 SMNT. Entre as amostras com *M. tuberculosis*, 22/84 tiveram cultura+/ BAAR negativo e entre as MNT, uma foi identificada como *M. abscessus*. Em 2 identificações, o nível de espécie não foi obtida (*Mycobacterium sp*) e 14 não foram identificadas (SMNT). Por outro lado, dos espécimes BAAR+/ cultura negativa, 5/67 é *M. tuberculosis*, 1/10 é *M. avium* e 2/13 não foram identificados (SMNT).

A análise dos testes laboratoriais utilizados na identificação do agente etiológico das infecções, mostrou que o teste molecular GeneXpert ou Xpert, RT-PCR, foi realizado em 65/142 (45,7%) dos espécimes clínicos, dos quais 46/65 (70,8%) foram positivos e, portanto, Mtb foi identificado. Quando se comparou estes resultados com os obtidos a partir do meio de cultura *in vitro* (padrão ouro), observou-se total concordância entre os 40 (100%) espécimes testados para os dois métodos (Tabela 11).

Tabela 11 Resultados do teste molecular, usando a plataforma automatizada GeneXpert baseada na amplificação de genes alvos por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), e do teste microbiológico de cultivo *in vitro*, em 40 espécimes clínicos, referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

GeneXpert	Cultura		Total
	Negativa	Positiva	
Negativo	6 (100 %)	0	6 (15%)
Positivo	0	34 (100 %)	34 (85%)
Total	6	34	40

Dados em N (%), frequência absoluta (frequência relativa)

Em seguida quando se comparou o teste molecular GeneXpert com o teste fenotípico microbiológico, bacterioscopia, em que foram analisados 43 espécimes clínicos de pacientes com pneumopatia pulmonar, obteve-se 100% de concordância entre os métodos (Tabela 12).

Tabela 12 Comparação entre os resultados obtidos no procedimento molecular automatizado GeneXpert com a baciloscopia em 43 espécimes clínicos pulmonares, referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

VARIÁVEIS		Baciloscopia		Total
		Negativa	Positiva	
GeneXpert	Negativo	11 (100%)	0 (0%)	11
	Positivo	0 (0%)	32 (100%)	32
Total		11	32	43

Dados em N (%), frequência absoluta (frequência relativa).

Por outro lado, ao compararmos os métodos microbiológicos, em 82 pacientes com tuberculose pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis*, observamos que a microscopia direta identificou 59/82 (72%) enquanto a cultura 73/82 (89%) dos casos de TB. Menor positividade da bacterioscopia foi observada entre os espécimes com cultura positiva (18/73, 24,66%), mas 4/9 (44,4%) culturas negativas foram baciloscopia positiva. Portanto, conferindo aos testes uma concordância baixa (60/82, 73%, $k=0,2241$) (Tabela 13).

Tabela 13 Resultados do teste microbiológico de visualização de bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaços corados pelo método de Ziehl Neelsen e cultura *in vitro*, em 82 espécimes clínicos de pacientes com pneumopatia pulmonar referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

VARIÁVEIS		Baciloscopia		Total
		Negativa	Positiva	
CULTURA	Negativa	5 (21,7%)	4 (6,8%)	9
	Positivo	18 (78,3%)	55 (93,2%)	73
Total		23	59	82

Concordância 73,0%, kappa = 0,2241 (95%IC)

Finalizando a análise dos testes laboratoriais de identificação, o teste do FC foi realizado em 107/142 (75,3%) dos crescimentos micobacterianos, estando presente em 73/107 (68,2%) amostras, das quais a maioria (68/73; 93,1%) era *M. tuberculosis*, 3/73 (4,2%) eram MNT (*M. szulgai*, *M. abscessus*, *Mycobacterium sp*) e 1/73 (2,8%) não foi identificada a nível de espécie (Figura 4-4).

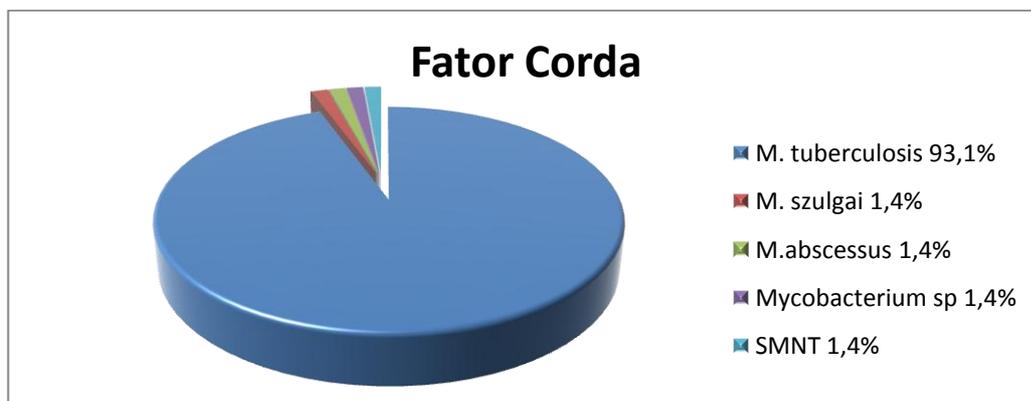


Figura 4-4 Espécies micobacterianas, com teste positivo para visualização de presença de fator corda, em amostras isoladas de 107 pacientes com suspeita de infecção referenciados no LACEN-PI, no período de janeiro de 2014 a março de 2015. SMNT= Suspeita de Micobactéria Não Tuberculosa.

O teste de sensibilidade às drogas foi realizado em 64/99 (64,6%) amostras de *Mycobacterium tuberculosis*, das quais 5/64 (7,8%) foram resistentes (Figura 4-5). Nenhuma resistência a PZA foi identificada.

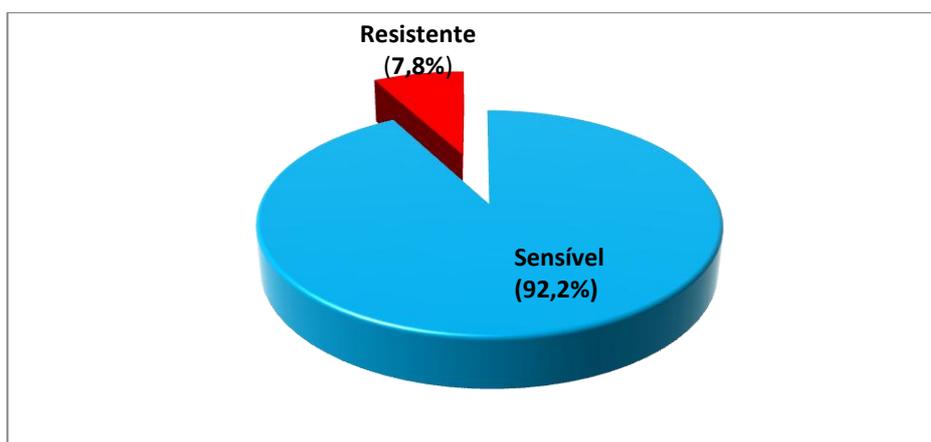


Figura 4-5 Resultado do teste de susceptibilidade aos tuberculostáticos realizados em 64 amostras de *M. tuberculosis* obtidos de espécimes clínicos oriundos de pacientes com tuberculose pulmonar, ou extrapulmonar, referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

Entre as amostras resistentes às drogas testadas, é importante notar que quatro mostraram perfil de MDR-TB, das quais uma extensivamente resistente (XDR-TB), isto é, apresentou resistência também a quinolona (ofloxacina) e a dois fármacos injetáveis de segunda linha (kanamicina e capreomicina), e adicionalmente é resistente a estreptomicina (SM) e etambutol (EMB); e a outra é resistente também a SM. Uma das amostras apresentou-se monoresistente a rifampicina (Tabela 14).

Tabela 14 Padrão de resistência aos fármacos em cinco amostras de *Mycobacterium tuberculosis*, isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar referenciados no LACEN-PI no período de janeiro de 2014 a março de 2015.

Padrões de Resistência	Droga	Número de amostras	Total n=64(%)	Número de casos
Uma Droga	RIF	1	1 (1,6)	1
MDR	INH/RIF	2	3 (4,7)	3
MDR+1 droga	INH/RIF+SM	1		
XDR+2 droga	INH/RIF/quinolona/ KAN/CAPR+EMB/SM	1	1 (1,5)	1

INH: isoniazida, SM: estreptomicina, RIF: rifampicina, KAN: kanamicina, CAPR: capreomicina, EMB: etambutol, XDR: extensivamente resistente.

5 DISCUSSÃO

O Brasil, assim como os países em desenvolvimento, enfrenta o desafio de diagnosticar precocemente as doenças cuja morbidade e letalidade são elevadas, objetivando reduzir o impacto econômico destas na política de saúde pública.

A taxa de incidência de TB no estado do Piauí é a menor dos estados do nordeste (15,4/100.000 hab), e quando comparada com a taxa nacional (33,5/100.000 hab) ou a taxa de alguns estados da federação como o Amazonas e Rio de Janeiro, que apresentam os maiores números de casos novos no país (BRASIL 2014). Entretanto, devido a condições deficitárias socioeconômicas e sanitárias de parte da população, e o clima tropical semiárido, esperava-se encontrar frequência mais elevadas de infecções por MNT.

O presente estudo mostrou que a frequência dos espécimes clínicos, enviados ao LACEN-PI, foi predominantemente pulmonar (90,1%), e a maioria das cepas identificadas pertencia ao CMTB (69,7 %), enquanto as MNT contaram 9,9 % dos isolados identificados. Estes dados mostram que a TB permanece não controlada na região. A TB diagnosticada no LACEN-PI está concentrada nas cidades mais densamente povoadas da região, como a capital Teresina e a cidade de Parnaíba. Possivelmente, as condições socioeconômicas deficitárias de parte da população e da infraestrutura de saúde pública, principalmente em Parnaíba, podem estar contribuindo para este quadro. Nosso estudo não foi desenhado para obtenção destes dados, mas as duas cidades apresentam melhor estrutura de busca de casos e diagnóstico para tuberculose e atendem também, pacientes de cidades circunvizinhas, inclusive de outros estados, no caso de Teresina. É importante ainda notar que a epidemiologia da TB referenciadas no LACEN-PI em 14 meses, corrobora a literatura, pois maior número de casos ocorreu entre os pacientes do sexo masculino e jovens (25 – 50 anos). De acordo com o último relatório do Ministério da Saúde, em 2012, entre os homens brasileiros, a doença acomete com mais frequência homens jovem (25-34 anos e a maior taxa de incidência da TB ocorre na faixa etária 45 a 54 anos com coeficiente de 50,2/100.000 hab, que é, aproximadamente, duas vezes maior em relação ao sexo feminino. Isto se reveste de maior gravidade, visto que a ocorrência da TB em parte da população jovem e produtiva a torna incapacitada para promover o sustento familiar, ferindo conseqüentemente, sua cidadania. Portanto, medidas socioeconômicas e melhor controle dos infectados, devem ser implementadas na região.

Os seres humanos podem ser infectados ou apenas colonizados com MNT, sem desenvolver a doença (KOURBETI & MASLOW 2000), visto que a exposição a MNT no ambiente é comum. Uma das principais limitações de nosso estudo foi a impossibilidade de obter um diagnóstico acurado na maioria dos casos SMNT (29/142; 20,4%), pois apenas um espécime clínico foi referenciado ao LACEN-PI e, segundo recomendação do Ministério da Saúde, são necessárias pelo menos duas amostras de escarro, do mesmo paciente, para confirmação do isolamento de MNT como agente causal do quadro clínico. Portanto, a frequência de infecção por MNT na comunidade amostrada pode estar subnotificada. Embora, os crescimentos micobacterianos sugestivos de MNT não tenham sido identificados por problemas de coleta, 2/14 amostras não puderam ser identificadas ao nível de espécie, mesmo utilizando os métodos moleculares. Portanto, a diversidade de MNT no ambiente e os poucos métodos disponíveis para identificação contribui também para subnotificação.

Por outro lado, também não se conhece a frequência de MNT isolados do ambiente no Piauí, não podendo desta forma, confirmar que os casos identificados, estão associados a uma dada exposição ambiental, mesmo porque o desenho de nosso estudo não tinha este objetivo. Entretanto, as espécies de MNT mais frequentes neste estudo estão classicamente associadas a potencial patogenicidade. Ueki et al. (2005), em um estudo nos anos de 1993 a 1996 em São Paulo, observou um aumento na identificação das espécies potencialmente patogênicas (*MAC* e *M. kansasii*). Nunes et al. (2014) relatam a identificação de *M. abscessus subsp. bolletii*, em estudo realizado no Rio Grande do Sul, sobre a persistência de um clone único, altamente resistente e emergente. Zamarioli et al. (2008), em um estudo realizado em São Paulo sobre frequência de MNT, identificaram, principalmente, as espécies *M. kansasii*, *Complexo M. avium* e *M. fortuitum*, correspondendo a 64% do total das cepas analisadas. Em 2007, no Piauí, em pacientes com infecção por MNT, as espécies mais frequentes foram *M. kansasii* e *M. gordonae* (BONA et al. 2011). Entre os casos suspeitos de MNT, em nosso estudo, seria possível que bacilos de origem ambiental ou que bacilos álcool ácido resistentes de outras espécies não pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, como *Rhodococcus spp*, pudessem estar contribuindo para as amostras isoladas (BARRETO et al. 2014).

No presente estudo, é curioso o isolamento de *M. asiaticum* em espécime pulmonar de um paciente do sexo masculino. Esta espécie foi descrita pela primeira vez em 1982 e embora de rara ocorrência, em 1989 Salem et al. descreveram que de 516 espécimes pulmonares, de pacientes do estado do Amazonas, 136 eram MNT, das quais, 8 (1,5 %) eram *M. asiaticum*, uma das 7 espécies potencialmente patogênicas identificadas no estudo. Em estudo retrospectivo realizado na Austrália avaliando as MNT isoladas entre 1989 e 2008, 23 isolados *M. asiaticum* foram descritos e os autores sugerem que a sua ocorrência pode estar

associada a regiões de climas mais quentes embora a maioria das outras espécies identificadas, estivessem de acordo com as comumente encontradas na literatura em estudos de MNT (GRECH et al 2010). Portanto, é possível que as condições climáticas do Piauí possam favorecer a presença desta espécie no ambiente.

Neste estudo, a coinfeção por TB/HIV, entre os que tiveram teste sorológico realizado para HIV foi de 48,7% (19/39), Entretanto, o número de pacientes testados foi muito baixo (27,5%) o que contribui para a subnotificação. Mas se considerarmos que a taxa nacional de coinfeção TB/HIV foi 10,4 %, onde 62,7 % dos casos novos de TB foram testados para coinfeção por HIV (BRASIL 2015), a frequência de coinfeção no LACEN-PI está mais elevada e, portanto, pode-se sugerir que há subnotificação e melhor estratégia diagnóstica precisa ser pensada. Soares et al. (2008), em um estudo realizado em hospital de referência no Piauí entre 2001 e 2004, identificou a co-infecção TB/HIV em pacientes que foram a óbito. A maioria destes, apresentaram até três infecções oportunistas com prevalência para a candidíase (37,8%) e tuberculose ativa (23,2%). Carvalho et al (2011), em estudo de vigilância utilizando registros dos Agravos de Notificação do Sistema de Informação tuberculose e AIDS no Brasil de 2000 a 2005, verificaram que a subnotificação de coinfeção TB-AIDS no período foi de 17,7 % e as maiores proporções de subnotificação, acima de 35%, foram observadas no Acre (Norte), Alagoas, Maranhão e Piauí (Nordeste), e as menores, cerca de 10%, em São Paulo (Sudeste) e Goiás (Centro-Oeste). Portanto, nosso estudo confirma que no Piauí a avaliação do status de infecção por HIV está deficitário.

O teste do FC realizado no LACEN-PI para identificação de CMTB mostrou 100% de concordância com as amostras identificadas como *M. tuberculosis*, entretanto, a especificidade do teste foi menor, pois foi evidenciado presença do FC em MNT. Sabe-se que a maioria das MNT não forma corda, exceto, algumas espécies como, *M. kansasii*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (BRASIL 2008), mas em nosso estudo as espécies de MNT que mostraram presença do FC foram, *M. szulgai*, *M. abscessus*, *Mycobacterium sp* e dois isolados SMNT. Simeão, et al. (2009), avaliaram 152 amostras, das quais 110 foram identificadas como *M. tuberculosis* e a presença de formação de corda correspondeu a uma sensibilidade de 96,4%. Coelho et al (2007) encontraram, em crescimento micobacteriano em meio sólido, 100% de sensibilidade entre as CMTB, e 89% de especificidade. Embora a presença de fator corda em CMTB em nosso estudo esteja de acordo com dados da literatura, a sua presença nas espécies de MNT está discordante. Portanto, um estudo mais extensivo em diferentes espécies de MNT deve ser realizado para melhor avaliar sua presença nas MNT.

Em nosso estudo, entre os espécimes que foram referenciados ao LACEN-PI, 56 eram de pacientes com pneumopatia pulmonar e foram submetidos ao processamento da plataforma automatizada GeneXpert (Xpert) e do cultivo *in vitro* para micobactérias. Considerando a cultura como padrão-ouro para o diagnóstico, o GeneXpert mostrou concordância de 100% (40/40), identificando todos os casos com cultura positiva. A mesma concordância foi obtida na comparação do GeneXpert com o resultado da baciloscopia, onde foram analisados 43 espécimes clínicos de pacientes com pneumopatia pulmonar por CMTB. Baciloscopia, é um teste simples, rápido e de baixo custo e portanto, é amplamente utilizado na rotina diagnóstica de TB, apresentando como desvantagem, sensibilidade relativamente baixa (50% -70%) (STEINGART et al. 2006), e portanto, concordando com os nossos resultados, onde em 72% dos espécimes a baciloscopia foi positiva. A cultura é laboriosa e morosa, porém, mais sensível e em nosso estudo identificou 85,9 % dos casos. Assim, o fato do teste molecular GeneXpert ter mostrado alta concordância com o padrão microbiológico, reforça o uso desta técnica para auxiliar no diagnóstico mais rápido da TB. Recente estudo multicêntrico demonstrou a boa sensibilidade deste teste molecular, onde 91% de sensibilidade e 99% de especificidade na identificação da TB foi obtido comparados com o resultado da cultura. Os autores ainda mencionam maior sensibilidade (95%) e especificidade (98%) na detecção de mutações no gene *rpoB* nos espécimes contendo *M. tuberculosis* resistente a rifampicina (BOHEME et al. 2011). Uma série de ensaios de diagnóstico com o GeneXpert foram realizados em países de alta carga de TB e todos descrevem aumento das taxas de TB com confirmação por Xpert, além de ótima relação custo-benefício, principalmente, em pessoas HIV-positivas (DUROVNI 2014; THERON et al. 2014; WHO 2011; PANTOJA et al. 2013).

Os métodos microbiológicos, cultura e baciloscopia, mostraram baixa concordância entre seus resultados (73%, 60/82; kappa = 0,241). Esta baixa correlação, está de acordo com as características destes testes, pois a cultura (padrão-ouro), embora de elevada sensibilidade, não alcança o percentual de 100%, pois um espécime contendo *M. tuberculosis* pode vir a ser negativo (BARRETO 2014). Isto está associado com a limitação de detecção da cultura e da qualidade da amostra, ou seja, se a amostra apresentar bacilos inativados ou se o número de bacilos estiver abaixo do limite mínimo de detecção, aproximadamente, de 10 a 100 bacilos/mL de espécime clínico. Já a baciloscopia, apresenta sensibilidade relativamente baixa, seu limite de detecção envolve um mínimo de 10^4 bacilos/ mL de escarro para obtenção de resultados positivos (BRASIL 2008).

O teste de susceptibilidade (TS) *in vitro* aos tuberculostáticos foi realizado apenas nos espécimes do *Complexo M. tuberculosis*. Quanto às MNT, de acordo com Griffith et al (2007) e Jenkins et al (2008), não há um consenso sobre o tratamento mais adequado e por este motivo, não é realizado comumente o TS, pois, raramente reflete a realidade do *status* da MNT. Entre as amostras de *M. tuberculosis* testadas no TS, (59/64; 92,2%) foram sensíveis a todas as drogas de esquema básico e 5/64 (7,8%) apresentaram-se resistentes. Perfil de MDR foi encontrado em 4/5 amostras, inclusive uma com perfil XDR, e apenas uma amostra foi monoresistente (RIF). Entretanto, nenhuma destas mostrou perfil de PZA resistente. Em estudo realizado em pacientes com *M. tuberculosis* internados em hospital referência no Rio de Janeiro, houve correlação significativa entre resistência a PZA e multirresistência, assim como, entre resistência a PZA e monoresistência a qualquer dos fármacos de primeira linha no tratamento da TB, sugerindo a importância de testar para resistência a PZA antes de se iniciar o tratamento com PZA em pacientes com tuberculose MDR ou monoresistente (FONSECA et al 2012).

O método das proporções (teste indireto) foi utilizado em cerca de metade dos TS, enquanto a outra metade dos testes obteve-se o perfil de susceptibilidade pelo método MGIT. Duas amostras tiveram a resistência a RIF confirmadas pelo GeneXpert. Ambas as metodologias, contribuem para o diagnóstico laboratorial mais rápido que os métodos convencionais, sendo de grande importância, principalmente, para a interrupção da cadeia de transmissão da TB e TB resistente. Da Silva Garrido et al. (2014), descreveram prevalência de TBMR primária de 1,7% (3/175) no Amazonas, Brasil. Prim et al (2015), identificaram entre os 53 isolados MDR-TB, oito diferentes mutações do gene *rpoB* e a maioria possuía resistência a outros fármacos que não a INH e RIF. Dados do I Inquérito de Resistência aos Medicamentos Antituberculose, revelaram proporções de 8,5% e 21% de resistência a qualquer medicamento para casos novos de TB e para casos com tratamento prévio, respectivamente (BRAGA et al 2003). Globalmente, estima-se TB-MDR em 3,3% dos novos casos de tuberculose e 20% dos casos previamente tratados (WHO 2015). Os dados encontrados em nosso estudo estão mais elevados que a estimativa global para os casos sem tratamento prévio e similar ao percentual obtido no inquérito de resistência, portanto, é importante realizar o TS das amostra de TB isoladas nos locais onde a técnica possa ser executada com acurácia. As informações obtidas fornecerão subsídios para direcionar estratégias de controle da moléstia.

O abandono do tratamento é uma causa importante para a emergência de cepas resistentes. A taxa de abandono de tratamento em 2013 no Brasil foi de 10,9% (BRASIL 2015) e em nosso estudo, taxa relativamente menor foi encontrada (6,1%), mas o fato de que três destes pacientes com TB serem bacilíferos, dos quais um caso MDR, e um quarto paciente ser TB extrapulmonar (LCR), mas albergando cepa XDR, desafia o sucesso do controle da TB no estado, pois configura um risco não só para contatos familiares, mas para a população de convivência com estes pacientes.

O presente estudo, embora com suas limitações, entre outras na identificação parcial das MNT, contribui para demonstrar que a TB continua a ser um problema de saúde pública no estado e que as MNT podem estar emergindo associadas às condições não só socioeconômicas da região, como também climática e de disponibilidade de técnicas moleculares para identificação. Para ambos os agravos, maior ênfase no diagnóstico rápido, utilizando conjunto de métodos disponíveis, são de fundamental importância, incluindo estimular os clínicos na coleta e envio de correta amostragem para favorecer a identificação do agente etiológico, principalmente, nos casos suspeitos de MNT.

6 CONCLUSÕES

1. O maior número de casos identificados era por infecção por Complexo *M. tuberculosis*.
2. A maioria dos pacientes com TB eram do sexo masculino e eram da faixa etária jovem e produtiva. Destes 6/99 (6,1%) abandonaram o tratamento.
3. Em 9,9% dos pacientes referenciados ao LACEN-PI, foram identificadas espécies de MNT.
4. Em 29/142 dos pacientes com espécimes clínicos arrolados no estudo, os crescimentos micobacterinos obtidos foram sugestivos de MNT, podendo a frequência real de MNT ser superior ao encontrado.
5. No grupo de MNT estudado, não foi possível uma identificação conclusiva em 2/14 espécimes, mesmo utilizando os métodos moleculares.
6. Apenas 39/142 pacientes apresentavam informações sobre o status sorológico em relação ao HIV. O conhecimento sobre esta ocorrência é importante para intervenções precoces em caso de coinfeção TB-HIV.
7. As maiores vantagens na utilização da metodologia Xpert na rotina laboratorial são a alta sensibilidade (houve 100% de concordância em relação a cultura e baciloscopia), a detecção de resistência à rifampicina e o tempo de produção do resultado em comparação aos métodos convencionais (aproximadamente 2 horas).
8. Dentro do grupo CMTB, 5/99 (7,8%) dos isolados apresentaram perfil de resistência.
9. Duas amostras resistentes a rifampicina apresentaram concordância entre os métodos fenotípico e genotípico (Xpert).

7 PERSPECTIVAS

1. Considerando que as metodologias MGIT e Xpert MTB/ RIF foram introduzida no LACEN-PI em 2014, faz-se necessária, avaliações prospectivas de sua real utilização ao longo dos próximos anos;
- 2 Comparar a concordância de resultados de resistência às drogas tuberculostáticas, com os métodos das proporções em meio sólido e em meio líquido automatizado.
- 3 Estudos para avaliar a acurácia das metodologias Xpert e cultura líquida MGIT quanto a detecção de CMTB em espécimes extrapulmonares como liquor, que é paucibacilar.
- 4 Investigar a frequência de espécies de MNT no ambiente do Piauí, correlacionando com os achados clínicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 3693-7.

Abel L, El-Baghdadi J, Bousfiha AA, Casanova JL, Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014 May 12; 369.

Aït-Khaled N, Enarson D, Bousquet J. Chronic respiratory diseases in developing countries: the burden and strategies for prevention and management Bull World Health Organ. Epub. 2001 Nov; 79(10): 971-9.

Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerg Infect Dis. 2010 Aug; 16(8): 1296-9.

Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. Infect Immun. 1991; 59: 1905-10.

Baess I, Mansa B. Acta Pathol Microbiol Scand B. Determination of genome size and base ratio on deoxyribonucleic acid from mycobacteria. 1978 Oct; 86B(5): 309-12.

Barnes DS. Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. Microbes Infect. 2000 Apr; 2(4): 431-40.

Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider DE Jr. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med. 1991 Jun 6; 324(23): 1644-50.

Barreto LB, Lourenço MC, Rolla VC, Veloso VG, Huf G. Use of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test in respiratory samples from HIV-infected patients in Brazil. J Bras Pneumol. 2014 Mar-Apr; 40(2): 148-54.

Bates JH. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. Clin Chest Med.1980 May; 1(2): 167-74.

Bates JH, Stead WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. Med Clin North Am. 1993 Nov; 77(6): 1205-17.

Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Annu Rev Biochem. 1996; 65: 215-39.

Bensi EP, Panunto PC, Ramos Mde C. Incidence of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, differentiated by multiplex PCR, in clinical specimens of a large general hospital. Clinics (Sao Paulo). 2013; 68(2): 179-84.

Bifani P, Moghazeh S, Shopsin B, Driscoll J, Ravikovitch A, Kreiswirth BN. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain. J Clin Microbiol. 2000 Sep; 38(9): 3200-4.

Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med. 2010; 363: 1005–1015.

Bona Md, Leal MJ, Martins LM, Silva RN, Castro JA, Monte SJ. Restriction enzyme analysis of the hsp65 gene in clinical isolates from patients suspected of having pulmonary tuberculosis in Teresina, Brazil. J Bras Pneumol. 2011 Sep-Oct; 37(5):628-35.

Braga JU; Werneck Barreto, A; Hijjar MA. Inquérito epidemiológico de resistência as drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil. Boletim de Pneumologia Sanitária, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 76-81, 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Procedimentos de Bacteriologia da Tuberculose do II Inquérito Nacional de Resistência a Drogas em Tuberculose no Brasil, Brasília, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. [Acessado em 20 de setembro de 2015]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.bvs/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. [Acessado em 21 de abril de 2015]. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Vol 44 nº 2. Brasília: 2014. [Acessado em 15 de out de 2015]. Disponível em: http://funedmg.gov.br/wp-content/uploads/2014/06/Boletim_Tuberculose_PNCT_2014.pdf

Brasil. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Vol 46 nº 9. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. [Acessado em 24 de setembro de 2015]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/27/2015-007---BE-Tuberculose>

Brooks GF, Butel JS, and Morse SA (1998) Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology. In Brooks GF, Butel JS and Morse SA, editors. Mycobacteria. 21st edition, United States of America: Lange Press. 279-283.

Brown-Elliott BA, Griffith DE, Wallace RJ Jr. Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis Clin North Am* 2002; 16:187.

Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Mar; 20(3): 196-201.

Campos Hisbello S. Manejo da doença micobacteriana não-tuberculosa. *Bol. Pneumol. Sanit.* 2000 Dez; 8 (2): 39-50.

Canetti G, Fox W, Khomenko A, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ, 41 (1969), pp. 21-43.

Carel C, Nukdee K, Cantaloube S, Bonne M, Diagne CT, Laval F, et al. *Mycobacterium tuberculosis* proteins involved in mycolic acid synthesis and transport localize dynamically to the old growing pole and septum. PLoS One. 2014 May 9; 9(5): 97148.

Carvalho CN, Dourado I, Bierrenbach AL. Underreporting of the tuberculosis and AIDS comorbidity: an application of the linkage method. Rev Saude Publica. 2011 Jun; 45(3):548-55.

Cayrou C, Turenne C, Behr MA, and Drancourt M, Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. Microbiology, vol.156:687–694, 2010.

Chen ML, Yu WC, Lam CW, Au KM, Kong FY, Chan AY. Diagnostic value of pleural fluid adenosine deaminase activity in tuberculous pleurisy. Clin Chim Acta. 2004 Mar; 341(1-2):101-7.

Chen YY, Chang JR, Huang WF, Hsu CH, Cheng HY, Sun JR, et al. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* East African-Indian family in three tropical Asian countries. J Microbiol Immunol Infect. 2015 Nov 27. pii: S1684-1182(15)00909-3.

Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leão SC. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. BMC Microbiol. 2008; 8: 1-12.

Clark-Curtiss JE, Thole JE, Sathish M, Bosecker BA, Sela S, de Carvalho EF, Esser RE. Protein antigens of *Mycobacterium leprae*. Res Microbiol. 1990 Sep-Oct; 141(7-8):859-71.

Coelho AG, Zamarioli LA, Reis CM, Duca BF. Detection of cord factor for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Bras Pneumol. 2007 Nov-Dec; 33(6):707-11.

Cole ST et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998. 393, 537-544.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. *Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice*. Butter Worth-Heinemann. Oxford, 2nd edition; 1997. 139 p.

Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One*. 2009 Nov 12; 4(11):e7815.

Conde MB, Soares SL, Mello FC, Rezende VM, Almeida LL, Reingold AL, et al. Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis: experience at an acquired immune deficiency syndrome reference center in Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Dec; 162(6): 2238-40

Conde MB, Marinho SR, Pereira Mde F, Lapa e Silva JR, Saad MH, et al. The usefulness of serum adenosine deaminase 2 (ADA2) activity in adults for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Respir Med*. 2002 Aug; 96(8): 607-10.

Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol*. 2014 Dec; 26(6):431-44.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003 Sep; 53(Pt 5):1305-14.

Crofton J, Horne N, Miller F. *Clinical Tuberculosis*. The Macmillan Press, London; 1992.

Darling MI, Donoghue HD. Insights from paleomicrobiology into the indigenous peoples of pre-colonial America - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Apr; 109(2):131-9.

Da Silva Garrido M, Ramasawmy R, Perez-Porcuna TM, Zaranza E, Chrusciak Talhari A, Martinez-Espinosa FE, Bühner-Sékula S. Primary drug resistance among pulmonary treatment-naïve tuberculosis patients in Amazonas State, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014 May; 18(5): 559-63.

Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2969–73.

Durovni B. XpertMTB/Rif for diagnosing pulmonary tuberculosis: a stepped-wedge cluster-randomized trial. *PLoS Med* (in press). 2014.

Dutt AK, Moers D, Stead WW. Smear - and culture-negative pulmonary tuberculosis: four-month short-course chemotherapy. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Apr; 139(4): 867-70.

Engel CL et al. *Medcurso 2004: do internato à residência: Pneumologia*. Rio de Janeiro: Ed. Frattari; 2004. v 3, 60 p.

Feyzioglu B, Dogan M, Sanli OO, Ozdemir M, Baykan M. Comparison of the performance of TK system with LJ and MGIT methods in the diagnosis of tuberculosis. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Apr 15; 7(4): 1084-8.

Fonseca JD, Knight GM, McHugh TD. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Infect Dis*. 2015 Mar; 32: 94-100.

Fonseca LS, Marsico AG, Vieira GBO, Duarte RS, Saad MHF, Mello FCQ. Correlação entre a resistência a pirazinamida e a resistência a outros fármacos antituberculose em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas em um hospital de referência. *J Bras Pneumol*. 2012; 38 (5): 630.

Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Feb; 46(2): 267-74.

Gillespie SH. *Mycobacterium tuberculosis*, in *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, Second Edition (eds S. H. Gillespie and P. M. Hawkey), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 2006.

Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A, Johnson JL, Riley LW, Maciel EL. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infect Dis*. 2014 Jan 8; 14:9.

Goto M, Nogushi Y, Koyama H, Hira K, Shimbo T, Fukui T. Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion: a meta-analysis. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 374-81.

Grech M, Carter R, Thomson R. Clinical significance of *Mycobacterium asiaticum* isolates in Queensland, Australia. *J Clin Microbiol.* 2010 Jan; 48 (1): 162-7.

Griffith DE, et al. An Official ATS/IDSA Statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, New York, 2007 v.175, p. 367.

Groenewald W, Baird MS, Verschoor JA, Minnikin DE, Croft AK. *Chem Phys Lipids* 2014 May; 180: 15-22.

Guirado E, Schlesinger LS, Kaplan G. Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin Immunopathol.* 2013 Sep; 35(5): 563-83.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005 Sep; 1(1):e5.

Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, Morgan MA, Novak SM, Rusch-Gerdes S, et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 748-52.

Hewlett D Jr, Horn DL, Alfalla C. Drug-resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. *JAMA.* 1995 Mar 22-29; 273(12): 916-7.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 9^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 597-603, 1994.

Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis.* 1993 Dec; 17(6): 968-75.

Iseman MD. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Mar 29; 91(7): 2428-9.

Iwai K, Maeda S, Murase Y. Archaeology of tubercle bacilli and tuberculosis. Kekkaku. 2010 May; 85 (5): 65-475.

Jenkins PA et al 2008. Clarithromycin vs ciprofloxacin as adjuncts to rifampicin and ethambutol in treating opportunist mycobacterial lung diseases and an assessment of *Mycobacterium vaccae* immunotherapy. Thorax. London, v.63, p.627.

Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res. 2004 Oct; 120(4): 290-304.

Keating LA, Paul RW, Huma M, Jacqueline KI, James D, R. Glyn Hewinson, Stephen VG. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. Molecular Microbiology 2005 56, 163–174.

Kourbeti IS, Maslow MJ. Nontuberculous Mycobacterial Infections of the Lung. Curr Infect Dis Rep 2000, 2:193-200.

Kritski AL. Tuberculosis preventive therapy for HIV-infected persons in less developed countries. Int J Tuberc Lung Dis. 2000 Feb; 4 (2 Suppl 1):S76-81.

Laniado-Laborín R. Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion: is it really an ideal test? A word of caution. Chest. 2005 Feb; 127(2): 417-8.

Leão SC et al. Practical handbook for phenotypic and genotypic identification of Mycobacteria. p.9-147, 2004. [Acessado em: 26 set. 2015]. Disponível em: <http://www.esmycobacteriology.eu/PDF%20files/foreword.pdf>.

Lee M, Sheng W, Hung C, Yu C, Lee L, Hsueh P. Mycobacterium abscessus Complex Infections in Humans. 2015. Emerging Infectious Diseases 21:1638-1646.

Lemos AC, Matos ED. Multidrug-resistant tuberculosis. *Braz J Infect Dis*. 2013 Mar-Apr; 17(2): 239-46.

Lopes AC. Tratado de clínica médica. 2. ed. São Paulo: Roca, 2006.

Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Oct; 19(4): 658-85.

Mitchison DA. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle*. 1985 Sep; 66(3): 219-25.

Niemann S, Richter E, Rüscher-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis subsp. caprae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 Mar; 52(Pt 2): 433-6.

Noll H, Bloch H, Asselineau J, Lederer E. The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta*. 1956; 20: 299–309.

Nunes Lde S, Baethgen LF, Ribeiro MO, Cardoso CM, de Paris F, De David SM, et al. Outbreaks due to *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* in southern Brazil: persistence of a single clone from 2007 to 2011. *J Med Microbiol*. 2014 Oct; 63(Pt 10): 1288-93.

Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T. Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from a next generation sequencer. *BMC Genomics*. 2015 Mar 20; 16(1): 218.

Organização Mundial da Saúde. Tratamento da tuberculose: linhas orientadoras para programas nacionais. Organização Mundial da Saúde (OMS). Lisboa, 2006.

Parker BC, Ford MA, Gruft H, et al. Epidemiology of infection by non-tuberculous bacteria. IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium avium* from natural waters. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 652–6.

Pantoja A, Fitzpatrick C, Vassall A, Weyer K, Floyd K. Xpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis: a cost and affordability analysis. *Eur Respir J*. 2013 Sep; 42(3): 708-20.

Peloquin CA. Using therapeutic drug monitoring to dose the antimycobacterial drugs. *Clin Chest Med*. 1997 Mar; 18(1): 79-87.

Prim RI, Schörner MA, Senna SG, Nogueira CL, Figueiredo AC, Oliveira JG, et al. Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Santa Catarina, southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 Aug; 110(5): 618-23.

Pottathil S, Anroop N, Varsha S, et al. Evaluation of rapid techniques for the detection of mycobacteria in sputum with scanty bacilli or clinically evident, smear negative cases of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106 (2011), pp. 620-624.

Ratledge C e Stanford JL. *The Biology of the Mycobacteria*, Vol. 2, Parte 1. New York. Academic Press; 1983. pp . 1-319.

Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis*. 1998 Apr-Jun; 4(2): 195-209.

Reichman LB, Hershfield ES. Tuberculosis: a comprehensive international approach. In *Lung Biology in Health and Disease* (Ed. C Lenfant) Vol. 66, Dekker, New York, 1993.

Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Oct 1; 174(7): 736-42.

Rombouts Y, Brust B, Ojha AK, Maes E, Coddeville B, Ellass-Rochard E, et al. Exposure of mycobacteria to cell wall-inhibitory drugs decreases production of arabinoglycerolipid related to Mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan metabolism. *J Biol Chem*. 2012 Mar 30; 287(14): 11060-9.

Rosemberg J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Bol. Pneumol. Sanit.*, Rio de Janeiro, v.7, n. 2, dez. 1999.

Runyon, E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am*, 43: 273-290, 1959.

Sabbatani S, Fiorini S. *Mycobacterium* infection in prehistoric humans: co-evolution in remote ages. *Infez Med*. 2015 Mar 1; 23(1): 83-93.

Sakula A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*. 1982 Apr; 37(4): 246-51.

Salem J, Maroja MF, de Carvalho FC, de Lima MO, Feuille A. Mycobacteria other than tuberculous e bacilli in sputum specimens from patients in Manaus. Amazonia, Brasil. *Acta Amazonica*, 19: 349-354. 1989.

Schatz, A. & S A. Waksman (1944). Effect of streptomycin upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, 57: 244-248.

Schultz MG. Robert Koch. *Emerg Infect Dis*. 2011 Mar; 17(3): 547-9.

Shah NS, Wright A, Bai GH, Barrera L, Boulahbal F, et al. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis*; 2007. 13(3): 380–7.

Shao Y, Chen C, Song H, Li G, Liu Q, Li Y, et al. The epidemiology and geographic distribution of nontuberculous mycobacteria clinical isolates from sputum samples in the eastern region of china. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Mar 16; 9(3).

Simeão FC, Chimara E, Oliveira RS, Yamauchi JU, Latrilha FO, Telles MA. Cord factor detection and macroscopic evaluation of mycobacterial colonies: an efficient combined screening test for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex on solid media. *J Bras Pneumol*. 2009 Dec; 35(12): 1212-6.

Soares VYR, Lúcio Filho CEP, Carvalho LIM de, S AMMM, Eulálio KD. Clinical and epidemiological analysis of patients with HIV/AIDS admitted to a reference hospital in the northeast region of Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 2008 Dec; 50(6): 327-332.

Steingart KR, Henry M, Ng V, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 570–581

Telente A, Marchesi F, Balz M, et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:175–8;

Theron G, Zijenah L, Chanda D, Clowes P, Rachow A, Lesosky M, et al. Feasibility, accuracy, and clinical effect of point-of-care Xpert MTB/RIF testing for tuberculosis in primary-care settings in Africa: a multicentre, randomised, controlled trial. *Lancet*. 2014; 383: 424–435.

Toossi, Z. & Ellner, J.J. Mechanisms of anergy in tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 215:221-38, 1996.

Tortora GJ, Funke BR, Case, CL. *Microbiologia*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.

Ueki S, Yoko M, Martins MC, Telles AS, Virgilio MC, Giampaglia CM, et al. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2005 Feb; 41 (1):18.

van Ingen, Zaur Rahim, Arnout Mulder, Martin J. Boeree, Roxane Simeone, Roland Brosch, and Dick van Soolingen. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerging Infectious Diseases*, 2012. 18: 653-655).

Wong SY, Lee JS, Kwak HK, Via LE, Boshoff HI, Barry CE 3rd. Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun; 55(6): 2515-22.

World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2014*. Geneva: WHO; 2014a. [Acessado em 22 de set de 2015]. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_reposrt/gtbr14_executive_summary.pdf?ua=1

World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2015. Geneva: WHO; 2015. [Acessado em 29 de out de 2015]. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis – emergency update. World Health Organization, Stop TB Department, Geneva (2008).

World Health Organization. Pathways to better diagnostics for tuberculosis. By the New Diagnostics Working Group of the Stop TB Partnership. World Health Organization, Geneva (2009).

World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Geneva, WHO Press, 2011. [Acessado em 2 de julho de 2013]. Disponível em: <http://who.int/tb/laboratory/mtbrifrollout/en/index.html>.

World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 2013. [Disponível 2015 out 18]. Tuberculosis. Fact sheet No 104. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

World Health Organization. Toman's Tuberculosis case detection treatment and monitoring: questions and answers. Geneva, 2004.

World Health Organization: Xpert MTB/RIF Implementation Manual: Technical and Operational “How-To”; Practical Considerations. Geneva: World Health Organization; 2014b. [Acessado em 29 de set 2015]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Books/NBK254323/>

Zamarioli LA, Coelho AG, Pereira CM, Nascimento AC, Ueki SY, Chimara E. Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2008 Aug; 34(8): 590-4.

Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003 Jan; 7(1): 6-21.

9 Apêndices e Anexos

9.1 Anexo

	UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUI - UESPI	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS E PERFIL DE SENSIBILIDADE A TUBERCULOSTÁTICOS EM PACIENTES ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NO PIAUI		
Pesquisador: Liline Maria Soares Martins		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 39508814.9.0000.5209		
Instituição Proponente: Universidade Estadual do Piauí - UESPI		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 990.812		
Data da Relatoria: 12/03/2015		
Apresentação do Projeto:		
<p>Pretende-se neste estudo caracterizar a prevalência de infecção micobacteriana na população de pacientes com sintomas pulmonares e extrapulmonares nos anos 2014 e 2015 atendidos em um serviço de referência em diagnóstico no Piauí, portanto, tem-se como objetivo conhecer o perfil de sensibilidade de Mycobacterium tuberculosis aos principais tuberculostáticos utilizado na prática clínica e correlacionar as infecções micobacterianas com dados clínicos e epidemiológicos. Os espécimes clínicos serão coletados de pacientes com suspeita de infecção por micobactérias atendidos na demanda espontânea do Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga (LACEN-PI). O diagnóstico clínico e laboratorial seguirão as recomendações e conduta de investigação médica em pacientes sintomáticos estabelecidos através do Programa Nacional de Controle de Tuberculose do Ministério da Saúde e que são referenciados aos centros de diagnósticos para tuberculose do país. Nestes serviços, serão realizados exames microbiológicos de bacterioscopia, cultura e teste de sensibilidade às drogas (TSD), bem como testes rápidos e técnicas de identificação molecular. Serão avaliados o conjunto de dados clínicos e informações constantes nos bancos de dados laboratoriais do LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí), tais como resultados de baciloscopia, cultura microbiológica, teste de sensibilidade, teste rápido molecular, técnicas de identificação molecular dos anos 2014 e</p>		
Endereço: Rua Olavo Bilac, 2335		
Bairro: Centro/Sul CEP: 64.001-280		
UF: PI Município: TERESINA		
Telefone: (86)3221-6658 Fax: (86)3221-4749 E-mail: comitedeeticauespi@hotmail.com		

Página 01 de 04



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
PIAUÍ - UESPI



Continuação do Parecer: 990.812

2015 totalizando 120 casos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

• Estimar a frequência de infecção por micobactérias CMTB e MNT em pacientes com suspeita de infecções micobacterianas cujas amostras clínicas são referenciadas ao LACEN – PI, e identificar a frequência de isolados de M. tuberculosis resistentes aos quimioterápicos usados no tratamento da TB.

Objetivo Secundário:

• Coletar dados sobre os resultados de identificação das espécies micobacterianas determinados métodos microbiológicos e moleculares em isolados clínicos micobacterianos. • Caracterizar o perfil de resistência aos tuberculostáticos das amostras de M. tuberculosis • Correlacionar os dados clínicos e epidemiológicos com as infecções por microrganismos do Complexo Mycobacterium tuberculosis e as MNT.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos para os pacientes decorrente dos procedimentos metodológicos laboratoriais realizados nas amostras. Na orientação para obtenção de escarro e urina, não há riscos. Amostras extrapulmonares, como líquor e outros líquidos biológicos, chegam ao LACEN-PI após serem coletados por procedimentos médicos e fazem parte da conduta de investigação médica para suspeita de infecção por micobactérias.

Benefícios:

A identificação das espécies micobacterianas associadas aos quadros de infecção por micobactérias no Piauí, e a caracterização das amostras de M. tuberculosis resistentes obtidas no estudo fornecerão subsídios para a melhoria das estratégias de intervenção e controle das micobacterioses causadas por espécies do MCTB e MNT.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tema de extremo interesse para o desenvolvimento de políticas de saúde pública e melhoria da qualidade de vida da população.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

Endereço: Rua Olavo Bilac, 2335
Bairro: Centro/Sul CEP: 64.001-280
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (86)3221-6658 Fax: (86)3221-4749 E-mail: comitedeeticauespi@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
PIAUI - UESPI



Continuação do Parecer: 990.812

- Folha de Rosto preenchida, assinada, carimbada e datada.
- Carta de Anuência da Instituição Coparticipante em papel timbrado da instituição, carimbada, datada e assinada ou Declaração do Pesquisador Responsável;
- Link do Currículo Lattes do pesquisador responsável;
- Projeto de pesquisa na íntegra (word/pdf);
- Instrumento de coleta de dados (questionário/entrevista/formulário);
- Termo de Consentimento da Utilização de Dados (TCUD).
(- Termo de confidencialidade dos dados coletados assinada pela responsável da pesquisa;
- Termo de compromisso de utilização dos dados, TCUD, 'nos comprometemos a manter a confidencialidade sobre os dados coletados através de um formulário conforme os dados contidos nos prontuários das pacientes que participam desta pesquisa' assinado pela pesquisadora responsável).

Recomendações:

APROPRIAR-SE da Resolução CNS/MS Nº466/12 (que revogou a Res. Nº196/96) e seus complementares que regulamenta as Diretrizes Éticas para Pesquisas que Envolvam Seres Humanos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com a análise, conforme a Resolução CNS/MS Nº466/12 e seus complementares, o presente projeto de pesquisa apresenta o parecer APROVADO por se apresentar dentro das normas de ética vigentes.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Olavo Bilac, 2335

Bairro: Centro/Sul

CEP: 64.001-280

UF: PI

Município: TERESINA

Telefone: (86)3221-6658

Fax: (86)3221-4749

E-mail: comitedeeticauespi@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
PIAUI - UESPI



Continuação do Parecer: 990.812

TERESINA, 18 de Março de 2015

Luciana Saraiva e Silva

Assinado por:

LUCIANA SARAIVA E SILVA
(Coordenador)

Profª. Drª. Luciana Saraiva e Silva
Coordenadora do CEP / UESPI
Matrícula: 179554-6

Endereço: Rua Olavo Bilac, 2335

Bairro: Centro/Sul

CEP: 64.001-280

UF: PI

Município: TERESINA

Telefone: (86)3221-6658

Fax: (86)3221-4749

E-mail: comitedeeticauespi@hotmail.com

9.2 Apêndice

FICHA DE COLETA DE DADOS

PROJETO: Micobactérias: identificação e perfil de sensibilidade a tuberculostáticos em amostras isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Piauí, janeiro 2014 a março de 2015

Nome: _____

Idade/Data de nascimento: _____ Sexo: (F) (M) RG: _____

Origem: _____ Data de entrada no estudo: ____/____/____

Local de entrada no estudo: _____ Outras informações: _____

Primeiro diagnóstico: () Retratamento () Controle

Sintomas: (não) (sim) Especificar: _____

Antecedentes: Diagnóstico prévio de infecção pelo HIV: (Sim) (Não) Se sim, data: ____/____/____

Último CD4+: _____ % Data: ____/____/____ Última CV: _____ Log _____ Data: ____/____/____

Outras informações: _____

Espécime

() Escarro () LCR () Urina () Fragmento de tecido () Lavado Brônquico () Aspirado Bronco alveolar

() Lavado gástrico () Líquido pleural () Líquido ascítico () Líquido Sinovial () Abscesso () Ferida Operatória

() Outros: _____

Técnica de descontaminação

() Petroff modificado () ác. oxálico () NALC () NaOH () Outros: _____

Exames laboratoriais (na entrada para o estudo):

- Baciloscopia: () <+ () BAAR + () BAAR ++ () BAAR +++

- Teste rápido molecular: () Detectável () Não detectável () Resist a RIF () Sens a RIF

- Cultura: () Löwenstein-Jensen () Ogawa-Kudooh () Cultura Líquida (MGIT

- Fator Corda: () Presença () Ausência

- MP764 (Imunocromatografia): () Positivo () Negativo

Resultado da Cultura: () Positiva () Negativa () Complexo M. tuberculosis () MNT

Identificação Molecular: _____

Método de Identificação Molecular: _____

Teste de Sensibilidade: () Método das Proporções () TS MGIT () Outros: _____

Antibiótico	S	R	Antibiótico	S	R
SM			Ofloxacina		
INH			Amoxicina		
RIF			Capreomicina		
BEM			Kanamicina		

Abandono/Tratamento CMTB: () SIM () NÃO _____ Data: ____/____/____

Óbito: () SIM () NÃO _____ Data: ____/____/____

Responsável pelo Preenchimento: _____

Instituição: _____ Tel: _____