

**PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL**

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS

FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO - FUNDAP

**Ana Flavia Tonelli Fernandes**

**Avaliação Comparativa da Baciloscopia e da Cultura Automatizada no  
Diagnóstico da Tuberculose em Hospital Universitário.**

Ribeirão Preto  
2010

# PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS

FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP

**Ana Flavia Tonelli Fernandes**

## **Avaliação Comparativa da Baciloscopia e da Cultura Automatizada no Diagnóstico da Tuberculose em Hospital Universitário.**

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/CRH/SES-SP e FUNDAP, elaborada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP/ Departamento de Clínica Médica.

**Área:** Microbiologia/Infecção Hospitalar

**Orientador (a):** Roberto Martinez

**Supervisor (a) Titular:** Rosa Helena A. R. Gironi

Ribeirão Preto

2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandes, Ana Flavia Tonelli

Avaliação comparativa da baciloscopia e da cultura automatizada no diagnóstico da tuberculose em hospital universitário. Ribeirão Preto, 2010.

28p.

Trabalho de Conclusão do Programa de Aprimoramento Profissional/SES, área de Microbiologia Clínica e de Infecção Hospitalar, Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

Orientador: Martinez, Roberto.

1. Micobactérias tuberculosas e não tuberculosas.
2. Baciloscopia.
3. Cultura Automatizada.
4. Cultura em Lowestein-Jensen.

## **Dedicatória**

**“Dedico este trabalho a minha família,  
aos amigos e aos colegas do laboratório  
de microbiologia e micobactérias do  
HCFMRP.”**

## **Agradecimentos**

Professor Doutor Roberto Martinez

Pelo apoio, orientação e colaboração.

Aos profissionais e amigos do Laboratório de Microbiologia e micobactérias do HCFMRP-USP, que participaram direta e indiretamente deste trabalho

Por toda a ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos amigos e colegas

Pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais, Otoni e Lucia e aos meus irmãos, Bruno e Marcela

Pelo apoio, compreensão e carinho.

Aos meus avós, Willian e Norma

Pelo apoio, confiança e carinho.

## Resumo

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa, com maior incidência nas aglomerações urbanas. É um problema de saúde pública, sendo que em 2003, a TB foi inserida na agenda de prioridades das políticas públicas do Brasil. Estima-se que mais de 50 milhões de brasileiros estejam infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*. O estudo foi realizado no Laboratório de Micobactérias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram coletados dados dos exames de baciloscopia e cultura para Micobactérias no ano de 2009, feitos em escarros e outros materiais. Para cultura, utilizou-se o método automatizado MB/Bact. A identificação das micobactérias foi feita pelo teste da niacina e pelo método de hibridização (GenProbe). Foram analisadas 3089 amostras para baciloscopia e 4386 amostras para cultura. 157 baciloscopias foram positivas (5,08%) e em 428 culturas houve crescimento de micobactérias (9,75%). O estudo revelou uma alta prevalência de micobactérias não tuberculosas nos pacientes da instituição. Uma análise comparativa entre baciloscopia e cultura mostrou a maior sensibilidade da cultura como método diagnóstico para micobactérias, justificando a adoção do método. Ainda, deixa claro a maior sensibilidade da técnica da cultura como método diagnóstico para micobactérias, contudo a baciloscopia tem menor custo, é mais rápida e revela a maior parte dos casos de tuberculose.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 O Gênero Mycobacterium .....	1
1.2 Manifestações Clínicas .....	2
1.3 Epidemiologia .....	3
1.4 Diagnóstico .....	4
1.4.1 Amostra .....	5
1.4.2 Método de Descontaminação/Digestão da Amostra-Método de Petroff ..	5
1.4.3 Baciloscopia .....	6
1.4.3.1 Método de Coloração-Ziehl Neelsen .....	6
1.4.3.2 Interpretação dos Resultados da Baciloscopia .....	6
1.5 Cultura .....	7
1.5.1 Cultura não-automatizada .....	7
1.5.2 Cultura Automatizada .....	8
1.6 Identificação .....	8
1.6.1 Teste da Niacina .....	9
1.6.2 Técnica de Hibridização .....	9
<b>2. OBJETIVO</b> .....	10
2.1 Objetivo específico .....	10
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
<b>4. RESULTADOS</b> .....	13
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	17
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	20
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	21

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O gênero *Mycobacterium*

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*, que possui um único gênero, denominado *Mycobacterium* (*fungus bacterium*), nome proposto por Lehmann e Neumann em 1896, em referência à película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos que era similar a produzida por alguns fungos.

Apresentam-se como bacilos retos ou levemente curvados, com 1 - 4µm de comprimento por 0,3 - 0,6µm de largura. Algumas vezes, podem apresentar-se na forma cocobacilar ou filamentosa, variando de espécie para espécie. Por exemplo, as células do *Mycobacterium xenopi* são muitas vezes filamentosas e as do *Mycobacterium avium* são quase que freqüentemente cocóides. São, de maneira geral, bacilos imóveis, não esporulados, aeróbios ou microaerófilos, sendo, sua principal característica, a capacidade de resistir à descoloração quando tratadas com álcool-ácido. Demonstrada pelo método de Ziehl-Neelsen, a álcool-ácido resistência é baseada no fato de que as micobactérias, quando tratadas pela fucsina fenicada, resistem à descoloração subsequente por uma solução de álcool-ácido, permanecendo coradas em vermelho. A álcool-ácido resistência é única propriedade do organismo intacto, como também de sua estrutura química, particularmente de seu conteúdo em ácido micólico. Algumas micobactérias, tais como o bacilo da tuberculose, contêm mais ácido micólico do que as espécies saprofiticas, e isso pode justificar o fato de eles serem mais fortemente ácido resistentes (EISENSTADT *et al*, 1995).

O mais importante gênero *Mycobacterium* do ponto de vista da etiologia das doenças humanas é o complexo *Mycobacterium tuberculosis* que engloba o *M. tuberculosis*, o *M. africanum* e o *M. bovis*. No entanto, outras micobactérias ocasionalmente determinam doenças, principalmente em imunodeprimidos, nos idosos e nos portadores de broncopneumopatias crônicas. Há ainda a possibilidade de essas micobactérias simplesmente colonizarem algumas pessoas, tornando imperiosa a necessidade de estabelecer critérios seguros para diferenciar colonização de infecção.

As doenças causadas por micobactérias não pertencentes ao grupo das *Mycobacterium tuberculosis* (MNTB) podem apresentar algumas características clínicas que permitam levantar a suspeita da etiologia já na abordagem inicial, o que é importante, principalmente pelas diferenças de sensibilidade aos quimioterápicos rotineiramente utilizados no tratamento da tuberculose.

Essas micobactérias oportunistas foram inicialmente denominadas como anônimas, e atualmente são conhecidas coletivamente como atípicas, micobactérias outras que não tuberculose, micobactérias não tuberculosas ou micobactérias do meio ambiente. A Sociedade Americana do Toráx (ATS) propõem o uso exclusivo do termo micobactérias não tuberculosas. As mais comuns são o *M. kansasii*, o complexo MAIS (*avium*, *intracelulare* e *scrofulaceum*), o *M. xenopi*, o *M. szulgai*, o *M. malmoense*, e o *M. leprae*. Além das não patogênicas como o *M. gordonae*, o *M. terrae*, o *M. flavescens* e o *M. smegmatis* (MORRONE, 2005).

## 1.2 Manifestações Clínicas

A Tuberculose (TB) é uma doença crônica ou subaguda, podendo apresentar períodos de remissão, retardando o paciente na busca de serviço médico especializado. Esta conduta pode agravar ainda mais seu estado clínico aumentando o tempo de transmissão do bacilo na comunidade. As manifestações clínicas da TB variam muito e dependem de diversos fatores, inerentes ao microorganismo e ao hospedeiro (imunodeficiência, nutrição e outros), bem como as suas interações, as quais influenciam diretamente na apresentação clínica da doença (ATS, 2000).

Como a TB é normalmente adquirida por inalação do bacilo, a localização inicial é no pulmão. Posteriormente pode ocorrer uma disseminação para outros órgãos, causando o que é chamado de tuberculose extra pulmonar (óssea, meningocefálica, renal, geniturinária e outras). Os sintomas gerais da TB pulmonar são febre, sudorese, perda ponderal, anorexia e adinamia. Todos esses sintomas e sinais são inespecíficos e podem estar presentes em outras enfermidades pulmonares. Inicialmente, nos pacientes não imunodeprimidos, o sintoma respiratório usualmente referido é a tosse acompanhada de expectoração mucopurulenta, às vezes com sangue e dor torácica (KRITSKI *et al.*, 2000; BATISTA *et al.*, 2001).

Nos casos da TB extra pulmonar entre os pacientes não imunodeprimidos, os sinais e sintomas dependerão do órgão afetado. As localizações mais freqüentes são pleura, linfonodos, sistema nervoso central, rins e ossos. Este tipo de TB normalmente apresenta maiores problemas no diagnóstico do que a TB pulmonar, pois envolve sítios relativamente inacessíveis e, pela natureza destes, pequenas quantidades de bacilos presentes podem causar sérios danos ao indivíduo infectado. O pequeno número de bacilos presente na amostra clínica acarreta uma maior dificuldade na identificação bacteriológica sendo que os procedimentos invasivos são, freqüentemente, requeridos para estabelecer o diagnóstico (DYE & FLOYD, 2006; SINGH & ESPITIA, 2007).

### 1.3 Epidemiologia

Estudos moleculares recentes indicam que o agente causal da TB, o *Mycobacterium tuberculosis*, tem residido no organismo humano há aproximadamente 10.000 anos, quando se começou a domesticar o gado (SEPKOWITZ *et al.*, 1995). Mesmo hoje, mais de cem anos após Robert Koch (1882) ter identificado o agente causador da doença, ela ainda se mantém como uma das infecções crônicas de maior índice de morbidade e mortalidade.

O aumento na incidência da TB nas últimas duas décadas é atribuído à deterioração dos sistemas de saúde pública, à pandemia do HIV, ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos e à alta correlação entre a doença e a pobreza. A associação com a pandemia provocada pelo vírus da imunodeficiência humana complicou o diagnóstico e dificultou o tratamento e o controle da tuberculose em diversas regiões do mundo (WHO, 1992). Acarretou também um aumento de casos de doenças provocadas por bactérias não tuberculosas, com muitas confusões no diagnóstico, especialmente no diferencial entre essas e as cepas multirresistentes (WALLACE *et al.*, 1997).

Apesar de ter um Programa Nacional de Controle da TB, o Brasil notifica cerca de 80.000 casos novos por ano, entretanto a estimativa anual da tuberculose é de 92.000 casos novos (OMS, 2009). Pode-se considerar que o Brasil vive uma situação intermediária, entre os países desenvolvidos e a grave situação de alguns países africanos. A expectativa que tínhamos na década de 1980 era de uma persistente e progressiva diminuição da doença, algo em torno de 4% a 6% ao ano. No início dos anos de 1990, observou-se uma diminuição da taxa de decréscimo da

tuberculose com uma discreta piora da morbi-mortalidade, especialmente nos Estados onde foi maior a co-infecção tuberculose/vírus da imunodeficiência humana (ROSEMBERG, 1999; BRASIL, 2002).

#### 1.4 Diagnóstico

A falta de um método de diagnóstico rápido e confiável para a TB constitui um sério problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. A detecção da doença em sua fase inicial é de vital importância para o início efetivo do tratamento, evitando assim a utilização inadequada de medicamentos potencialmente tóxicos, como também para interromper a cadeia de transmissão.

O diagnóstico clínico precoce da doença se faz bastante complicado, sobretudo quando a TB ocorre associada a outras enfermidades (infecção pelo HIV, neoplasias malignas, pós transplantes, etc.), quando então o diagnóstico laboratorial é de extrema importância. Com o advento da infecção pelo HIV, tornou-se mais difícil o diagnóstico da TB, em razão da maior ocorrência de formas clínico-radiológicas atípicas (MELLO *et al.*, 2006).

O Programa de Controle da Tuberculose no país tem por base a baciloscopia de escarro e a cultura, e admite o diagnóstico presuntivo, quando baseado nos achados clínicos e radiológicos característicos da doença. Os resultados obtidos, ainda que suficientes do ponto de vista epidemiológico são inespecíficos, não permitindo, isoladamente, o diagnóstico conclusivo da tuberculose. Exames bacteriológicos mais complexos são necessários para a definição da etiologia.

No auxílio do diagnóstico laboratorial para a conclusão final, a mais importante contribuição é o achado do bacilo, seja pela inspeção direta (baciloscopia), ou por seu isolamento em cultivo (meios de cultura). Diferentes meios de cultura, tanto na forma sólida quanto na líquida podem ser utilizados para cultivar micobactérias. O meio Lowenstein-Jensen (LJ) é o mais utilizado no país. O tempo médio de formação de colônias do *M. tuberculosis* é de quatro semanas, sendo esta sua grande desvantagem (BRASIL, 2002). Assim, fez-se necessário diagnósticos mais rápidos gerando o desenvolvimento de métodos automatizados tais como o BacT/Alert que é utilizado no laboratório de Micobactérias do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

### 1.4.1 Amostra

Muitos tipos de amostras clínicas podem ser obtidas para diagnóstico bacteriológico. Se a suspeita for de TB pulmonar, devem ser coletadas amostras do trato respiratório, como escarro espontâneo, escarro induzido, lavado bronco-alveolar ou biópsia pulmonar. No caso de escarro, três amostras devem ser coletadas pela manhã em dias alternados (FINCH & BEATY, 1997; NELSON *et al*, 1998; DORRONSORO *et al*, 2000). Nos casos em que o paciente não produz escarro espontaneamente, poderá ser feita a indução através da inalação de uma solução salina hipertônica, ou através da broncoscopia. No caso de TB extra pulmonar, a amostra a ser coletada depende do local onde há suspeita de infecção (DE GARCIA *et al*, 1988).

### 1.4.2 Método de Descontaminação/ Digestão da Amostra-Método de Petroff

Tem como objetivo a liquefação de debris orgânicos (digestão) e eliminação de microrganismos contaminantes com crescimento mais rápido que possam prejudicar a recuperação das micobactérias. Faz-se necessária em amostras que possuem microbiota mista de bactérias tais como: escarro, lavado bronco alveolar, pele, lavado gástrico, urina e fezes.

A descontaminação é feita através da utilização de substâncias químicas tóxicas aos microrganismos eventualmente presentes. O tempo de exposição a estas substâncias, assim como a concentração utilizada é de extrema importância, pois determina a não toxicidade as micobactérias. Assim, o protocolo deve ser seguido rigorosamente.

O material biológico a ser descontaminado é transferido para um tubo cônico estéril com tampa de rosca. Adiciona-se um volume igual ao da solução de trabalho de hidróxido de sódio com vermelho de fenol (vermelho de fenol 0,004% em NaOH a 4%) ao volume do espécime contido no tubo cônico. Após homogeneização o tubo é incubado por 20 minutos a temperatura ambiente (20° a 25°C) para descontaminação do espécime clínico. A mistura é então centrifugada a 3000 rpm, durante 15 minutos. Após assentado o sedimento, elimina-se o sobrenadante cuidadosamente. O sedimento é neutralizado com ácido clorídrico (HCl) 2N , gota a gota, até atingir a cor âmbar (pH 6,5 a 7,2). O sedimento é utilizado para o diagnóstico (BRASIL, 2008).

### 1.4.3 Baciloscopia

A baciloscopia direta do escarro é o método básico para o diagnóstico da TB na forma pulmonar. Consiste na visualização microscópica do bacilo da tuberculose após fixação em lâmina e coloração específica do material a ser analisado. O método de coloração específica mais utilizado é o de Ziehl-Neelsen (BRASIL, 2002).

Todas as amostras clínicas, exceto sangue e medula óssea, devem ser examinadas por algum método de coloração, para isso é preparado um esfregaço de no máximo 1 a 2 cm de diâmetro.

A baciloscopia do escarro, desde que executada corretamente em todas as suas fases, permite detectar de 60% a 80% dos casos de tuberculose pulmonar, o que é importante do ponto de vista epidemiológico, já que os casos bacilíferos são os responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão. A metodologia é simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo. No entanto, é relativamente pouco sensível, e não é específico uma vez que não é possível distinguir entre as espécies de micobactérias (BROOKS *et al.*, 1995).

#### 1.4.3.1 Método de Coloração- Ziehl-Neelsen

Os esfregaços são fixados à chama e, em seguida, cobertos pelo corante fucsina fenicada. As lâminas são aquecidas durante cinco minutos, até libertar vapores sem chegar a ferver. Após serem lavadas em água corrente, é feita a descoloração durante 90 segundos, com solução álcool-ácido. Novamente as lâminas são lavadas em água corrente, e o esfregaço é coberto com azul de metileno por trinta segundos. Após secas, as lâminas são examinadas na objetiva de imersão (100x) analisando-se 300 campos microscópicos.

#### 1.4.3.2 Interpretação dos Resultados da Baciloscopia

Resultado	Numero de microorganismos
Negativo	0
Duvidoso, repetir coloração	1-2/ 300 campos
+ (Raros)	1-9/100 campos
++ (Alguns)	1-9/10 campos
+++ (Freqüentes)	1-9/campo
++++ (Numerosos)	>9/campo

(MANUAL DE MICROBIOLOGIA DA ANVISA/ MODULO VI, 2009).

A quantidade mínima de bacilos necessária para ser detectada na baciloscopia é de 5.000 a 10.000 unidades por ml de amostra e sua sensibilidade varia de 50% a 80% em relação à cultura. Isso significa que um esfregaço negativo não exclui a possibilidade de infecção por *M. tuberculosis*. Esse fato é ainda mais notável quando a infecção ocorre em outros órgãos, onde um número ainda menor de microorganismos pode causar manifestações clínicas (STEINGART *et al.*, 2006).

## **1.5 Cultura**

O isolamento de micobactérias em meio de cultura é um método mais sensível que a baciloscopia tanto para TB pulmonar quanto para extra pulmonar, podendo detectar de 10 a 1000 bacilos viáveis por ml de amostra. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença (HOBBY *et al.*, 1973). A cultura é indicada para os suspeitos de TB pulmonar persistentemente negativos ao exame direto (baciloscopia), para o diagnóstico de formas extra pulmonares e para os casos de suspeita de resistência bacteriana aos fármacos, quando deve ser realizado o teste de suscetibilidade aos antibióticos (BRASIL, 2002).

### **1.5.1 Cultura não automatizada**

Os métodos clássicos para cultura de micobactérias utilizam a semeadura da amostra em meios de cultura sólidos. Os meios de cultura mais comumente utilizados são meios sólidos a base de ovo, Löwenstein-Jensen (LJ) e Ogawa-Kudoh. Têm a vantagem de serem os de menor custo e de apresentarem um índice de contaminação menor. A desvantagem do meio sólido é o tempo de detecção do crescimento bacteriano que varia de 14 a 30 dias podendo se estender por até oito semanas. As culturas semeadas em LJ ficam na estufa, organizadas de acordo com a data de entrada na Seção e determinação do período aproximado das culturas (mês atual, 30, 45 ou 60 dias). São feitas duas leituras semanais dessas culturas durante as duas primeiras semanas e depois uma vez por semana até completar as oito semanas. As culturas que apresentam crescimento em até oito semanas de incubação são submetidas à coloração de Ziehl –Neelsen, caso o crescimento seja sugestivo de micobactérias. Uma vez confirmado o crescimento de micobactérias, estas devem ser encaminhadas para a identificação (Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2010).

### 1.5.2 Cultura Automatizada

Embora conhecido há décadas, o meio líquido para o cultivo de micobactérias nunca despertou muito a atenção de micobacteriologistas, e de fato esse tipo de meio é muito suscetível a contaminações por microorganismos de crescimento rápido. Porém, combinando o uso de antimicrobianos com esses meios, tornou-se possível inibir o crescimento de um grande espectro de contaminantes, permitindo a associação do uso de meios líquidos com a automação para a detecção do crescimento de micobactérias.

O sistema BacT/Alert 3D, utilizado no laboratório de micobactérias do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, possui um meio de cultura enriquecido com OADC e acrescentado de antibióticos como a polimixina B, Anfotericina B, Vancomicina, sulfametoxazol e azlocilina. A presença desses antibióticos não dispensa o processo de descontaminação das amostras. Possui sensor de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) no fundo do tubo inoculado que muda da cor verde para amarelo com o CO<sub>2</sub> produzido pelo metabolismo micobacteriano. Essa mudança de coloração altera a intensidade do raio de luz incidido no fundo do tubo que é captado por um sensor. O monitoramento contínuo dá notificação imediata de resultados com alertas visuais e sonoros (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

### 1.6 Identificação

A identificação da espécie da micobactéria isolada pode ser feita através da análise morfológica das colônias, nos meios sólidos, associado ao uso de testes bioquímicos clássicos, cromatográficos (HPLC), e moleculares (Accuprobe - Genprobe®, PRA®) por laboratórios de alta complexidade e por técnicas validadas. O *M. tuberculosis* apresenta o teste da niacina positivo, fraca atividade da catalase, que desaparece com o aquecimento, e o teste da redução do nitrato também positivo.

Uma alternativa possível e disponível é a utilização de sondas genéticas, aplicáveis apenas às culturas, e capazes de identificar, através da técnica de hibridização, o complexo *M. tuberculosis*, o *M. avium*, o *M. intracellulare*, *M. kansasii* e *M. gordonae*, em poucas horas (Accuprobe - Gen Probe Inc.®).

Outras alternativas, são os testes de Biologia Molecular: seqüenciamento genético por PCR, a técnica de microarranjos do ADN, e a técnica de PCR aplicada para a detecção da proteína hsp65 (CASTELO FILHO, *et al*, 2004). No entanto, não estão disponíveis em todos os Centros de Diagnóstico e Hospitais.

### 1.6.1 Teste da Niacina

A niacina atua como um precursor na biossíntese de co-enzimas envolvidas nas reações de óxido-redução da síntese metabólica de todas as micobactérias. Embora a niacina seja produzida por todas as micobactérias, somente algumas espécies do Complexo *M. tuberculosis* como *M. tuberculosis*, *M. africanum* e raras espécies de Micobactérias Não tuberculosas, como *M. simiae*, *M. chelonae* e *M. marinum* produzem quantidades detectáveis pelo teste *in vitro*. As fitas comerciais estão impregnadas com cloramina e tiocianato de potássio acidificado e ácido p-aminosalicílico (PAS). A combinação desses reagentes leva a formação e liberação de cloreto de cianogênio, o qual reage com PAS na presença da niacina produzindo uma coloração amarela. O teste da niacina deve ser realizado para as espécies de crescimento lento e acromógenas e a cultura deve ter entre 4 e 5 semanas de crescimento em meio sólido, com pelo menos 50 colônias.

O procedimento é realizado no HCFMRP-USP e segue o seguinte protocolo: Adiciona-se 1,5ml de água destilada estéril nos frascos das culturas teste e nos controles de referência positiva e negativa. São feitos vários cortes na superfície do meio de cultura com uma alça descartável estéril para permitir a extração da niacina contida no meio de cultura. Os tubos são colocados em posição horizontal, de modo que o líquido cubra toda a superfície do meio, por 20 a 30 minutos. Transfere-se 0,6ml do líquido, utilizando uma pipeta de Pasteur descartável e estéril, para um tubo com tampa de rosca. A fita do Teste Niacina é colocada dentro do tubo que deve permanecer fechado até a leitura. Após 15 minutos em temperatura ambiente (25°C) deve ser observado o desenvolvimento da coloração amarela no líquido e não na fita (Brasil, 2008).

### 1.6.2 Técnica de Hibridização

O teste é baseado no sistema de amplificação mediado por transcrição reversa, utiliza a região 16S do RNA ribossomal (rRNA), específica do complexo *M. tuberculosis*, como alvo da detecção. Isso torna o teste mais sensível, uma vez que o número de rRNAs é de aproximadamente 2.000 cópias por célula. O teste utiliza uma sonda de DNA marcada com um éster de acridina através de uma hibridização feita em placas de ELISA. O processo é isotérmico, o que dispensa o uso de termocicladores, necessitando apenas de um luminômetro fornecido pelo fabricante.

A reação é desenvolvida em um único tubo o que ajuda a evitar problemas de contaminação cruzada. O procedimento pode ser realizado em 2h e 30 min.

Para a execução da técnica, em cada exame, é colhida uma quantidade de colônias (cerca de 3 alças), e a amostra é exposta a um processo de lise com reagentes específicos contidos no kit para extração do material genético. Juntamente com os reagentes de lise a amostra é homogeneizada e colocada em um sonicador (emissor de ultrassom) por quinze minutos para que a extração seja realizada. Após esse período a amostra é retirada do sonicador, evitando agitações, e por dez minutos fica exposta a temperatura ambiente  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Após a extração procede-se a hibridização de 100 $\mu\text{l}$  do lisado com a sonda genética. Através de um reagente de seleção específico e homogeneização, o material que não foi hibridizado é eliminado da reação. A leitura e interpretação são realizadas logo a seguir com o auxílio do luminômetro, após repouso de cinco minutos a temperatura ambiente. A leitura é expressa em RLU (Unidade Relativa de Luz).

A sensibilidade deste teste varia entre 91,7% a 100% em amostras com baciloscopia positiva e de 65,5% a 92,2% em amostras com baciloscopia negativa (WOODS *et al.*, 2001; PIERSIMONI & SCARPARO, 2003).

## **2. OBJETIVO**

Foi feito um levantamento comparativo da positividade das amostras clínicas utilizando como método de análise a Baciloscopia, quando indicada para a amostra em questão, e a cultura automatizada.

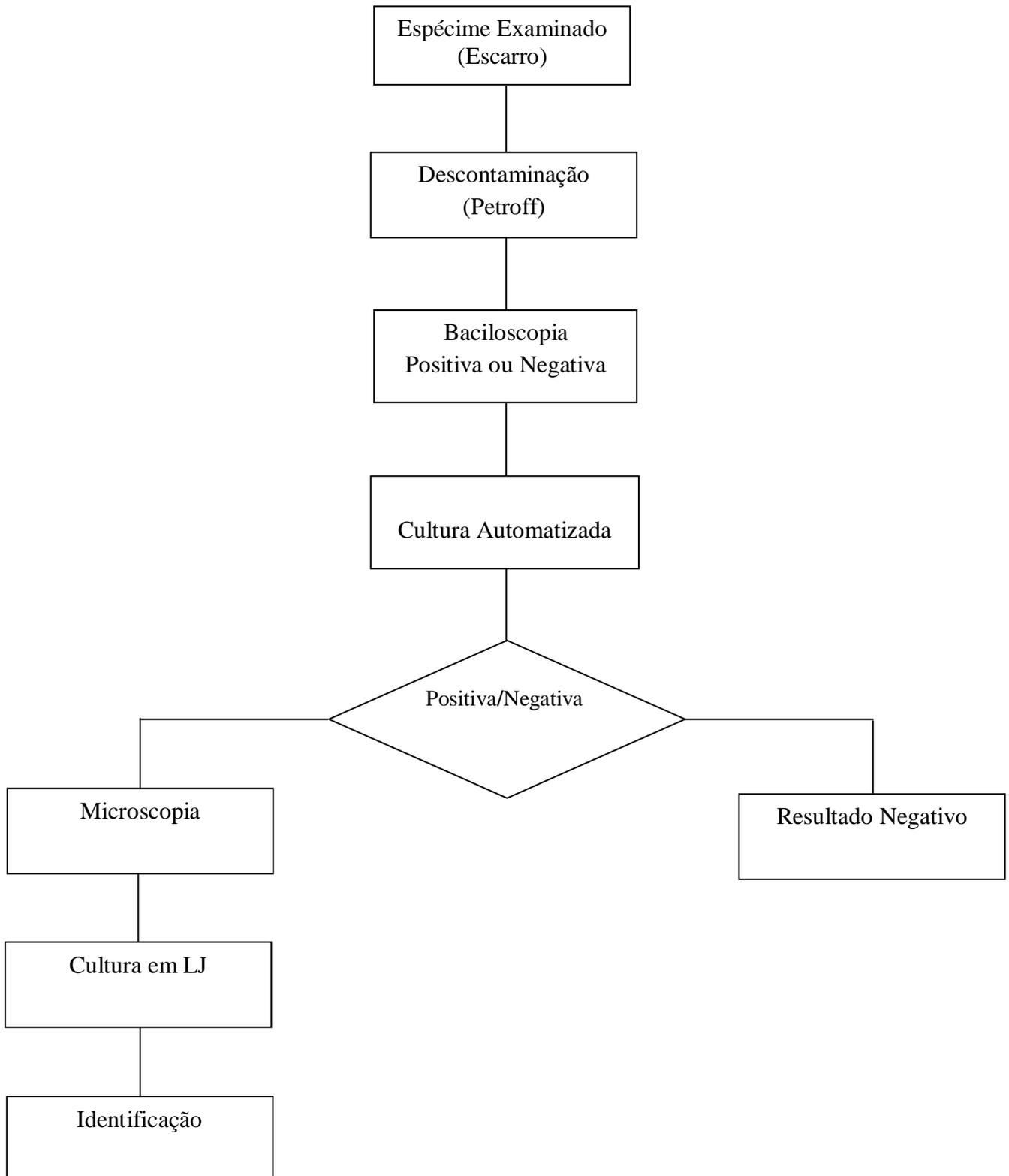
### **2.1. Objetivo Específico**

Devido ao fato do escarro ser o material clínico com um número significativamente maior de análises quanto à presença de micobactérias, o estudo foi focado tanto na sensibilidade dos métodos utilizados para esse espécime clínico, assim como na prevalência da infecção por *M. tuberculosis* nos pacientes do HCFMRP-USP com suspeita dessa infecção, visto que o escarro é a amostra clínica de escolha para o diagnóstico de tuberculose pulmonar.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Entre Janeiro e Dezembro de 2009, 4.386 espécimes foram analisados no Laboratório de Micobacteriologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - HCFMRP-USP. Esta instituição oferece nível terciário de assistência médica a pacientes referenciados pelo Sistema Único de Saúde, incluindo casos de pneumopatias complexas e/ou crônicas e de pacientes imunossuprimidos com doenças pulmonares oportunistas. Esses espécimes foram examinados por baciloscopia para bacilos álcool-ácido resistentes, segundo o método de Ziehl-Neelsen, semeado no meio LJ e no sistema automatizado BacT/Alert 3D de acordo com as características e protocolos estabelecidos para cada espécie de amostra clínica.

Os exames das amostras de escarro foram realizados após descontaminação pelo método de Petroff, com baciloscopia para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e cultura automatizada seguindo as orientações normativas do Ministério da Saúde. Os resultados positivos foram confirmados por lâmina confeccionada a partir da cultura automatizada, corado pelo método de Ziehl-Neelsen e lido pela microscopia óptica. Em seguida, procedeu-se a cultura no LJ com posterior identificação da espécie. O processo de análise dessas amostras segue o Fluxograma abaixo.

**Fluxograma do processamento das amostras de escarro no HCFMRP-USP**

#### 4. RESULTADOS

No período estabelecido para o estudo foram coletadas 4.386 amostras, das quais 131 foram excluídas por se tratar de amostras contaminadas. Foram, portanto, analisadas 4.255 amostras provenientes de mais de 14 tipos de espécimes clínicos.

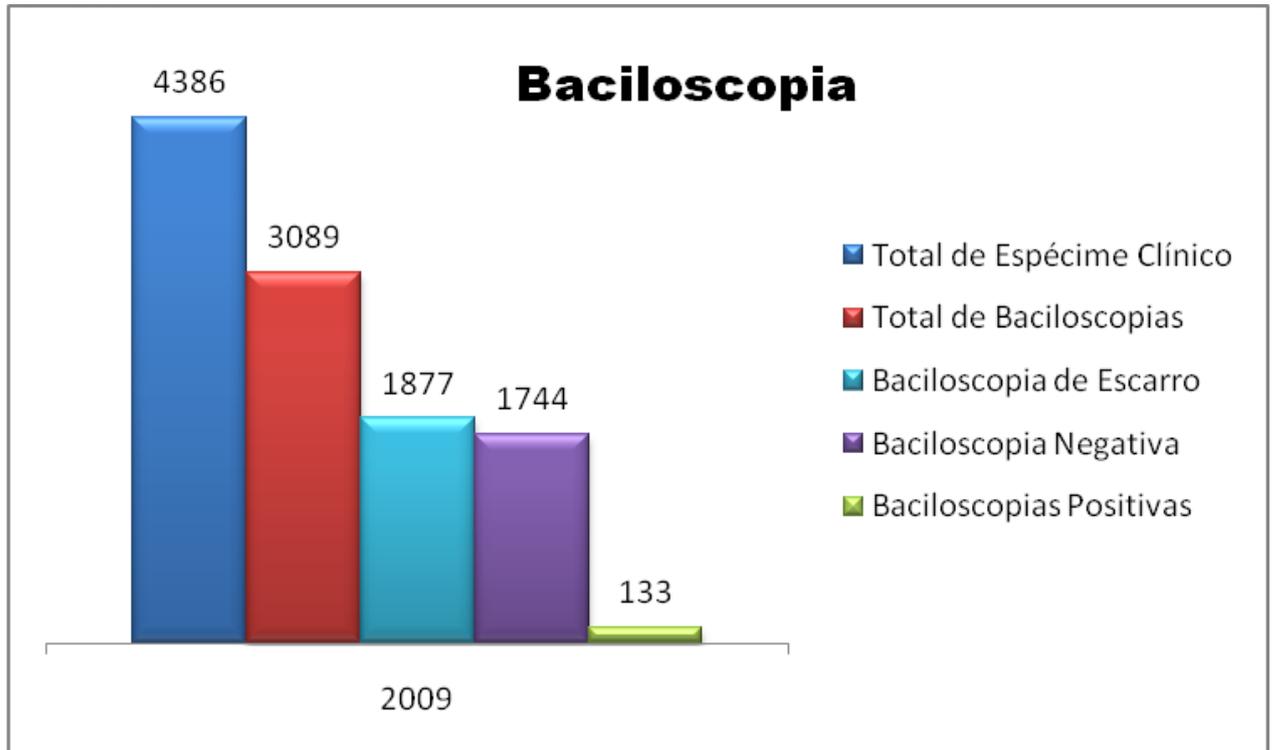
A Tabela 1 mostra os diferentes espécimes analisados por baciloscopia, a quantidade de análises feitas no ano de 2009, e a positividade das amostras.

**Tabela 1. Positividade para micobactérias das amostras clínicas analisadas por Baciloscopia na Micobacteriologia do HCFMRP-USP-2009**

Espécime Clínico	Total de Amostras	Baciloscopia		
		Negativa	Positiva	% Positiva
Escarro	1877	1744	133	7.08
Lavado Brônquico	173	172	1	0.58
Escovado Brônquico	1	1	0	0
Fragmento Pleural	67	65	2	2.98
Lavado Gástrico	114	109	5	4.38
Líquido Pleural	137	137	0	0
Líquido Ascítico	50	50	0	0
Líquido Pericárdico	9	9	0	0
Líquido Sinovial	39	39	0	0
Urina	143	143	0	0
Linfonodo	22	19	3	13.63
Outros	457	444	13	2.84
<b>Total</b>	<b>3089</b>	<b>2932</b>	<b>157</b>	<b>5.08</b>

A representação gráfica desses dados foi feita com o objetivo de uma melhor percepção da sensibilidade do método. Devido ao fato do escarro ser o espécime clínico de maior representatividade, os dados de análise expressos no Gráfico1 baseiam-se na sua positividade, facilitando assim a análise em questão.

**Gráfico1. Positividade da Baciloscopia como método diagnóstico para BAAR no Escarro**



As amostras clínicas são submetidas à cultura independentemente do resultado obtido na baciloscopia, ou seja, as amostras com baciloscopia negativa são semeadas em meio líquido automatizado para minimizar as chances de falso diagnóstico, pois bacilos em quantidade inferior a 5.000 unidades por ml de amostra não são detectados na baciloscopia. As amostras positivas tanto na baciloscopia, como na cultura em meio líquido automatizada são semeadas em LJ com o objetivo de identificação. A Tabela 2 mostra os diferentes espécimes clínicos que foram analisados por cultura no ano 2009, sua quantidade e positividade. Além de mostrar o número de culturas contaminadas no período estudado.

**Tabela 2. Amostras Clínicas analisadas segundo o resultado da cultura para micobactérias no HCFMRP-USP-2009**

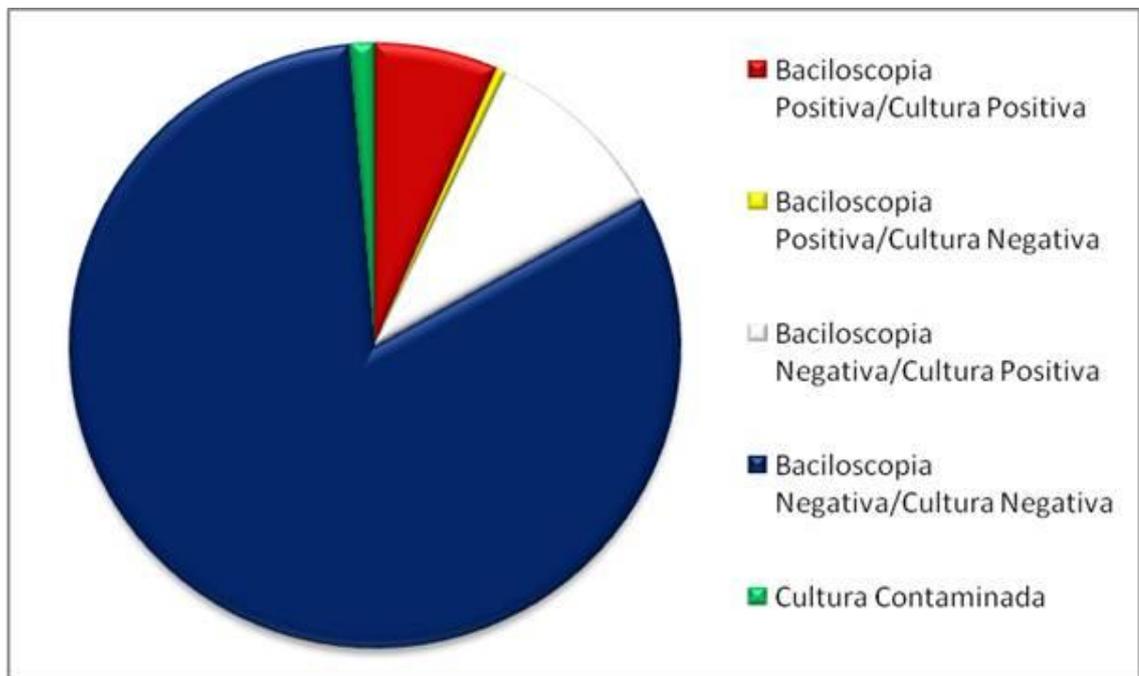
Espécime Clínico	Total de Amostras	Cultura				
		Negativa	Positiva	Contaminada	Positiva %	Contaminada %
Escarro	1877	1544	308	25	16.4	1.33
Lavado Brônquico	173	164	7	2	1.15	4.04
Escovado Brônquico	1	1	0	0	-	-
Fragmento Pleural	67	57	7	3	10.44	4.47
Lavado Gástrico	114	102	10	2	8.77	1.75
Líquido Pleural	137	131	6	0	4.37	-
Líquido Ascítico	50	49	0	1	-	2
Líquido Pericárdico	9	9	0	0	-	-
Líquido Sinovial	39	37	1	1	2.56	2.56
Líquor	749	740	1	8	0.13	1.06
Urina	143	141	2	0	1.39	-
Linfonodo	22	17	5	0	22.72	-
Sangue	530	425	60	45	11.32	8.49
Medula Óssea	18	15	1	2	5.55	11.11
Outros	457	395	20	42	4.37	9.19
<b>Total</b>	<b>4386</b>	<b>3827</b>	<b>428</b>	<b>131</b>	<b>9.75</b>	<b>2.98</b>

Foram feitas comparações, quanto à positividade das amostras de escarro submetidas à baciloscopia direta em relação à positividade pós cultura dessas amostras. Esses resultados foram expressos na Tabela 3 e representados no Gráfico 2.

**Tabela 3. Resultado percentual da análise de escarros por baciloscopia e cultura automatizada no HCFMRP-USP - 2009**

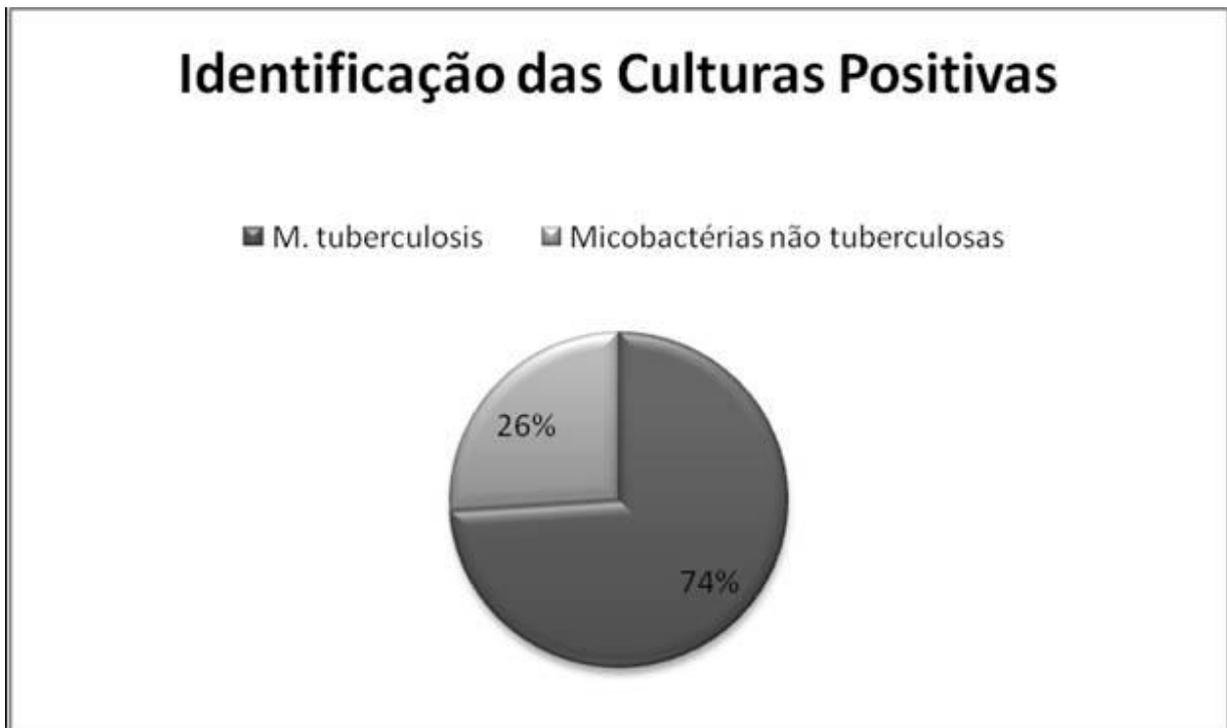
	Cultura- n°(%) das Amostras			
Baciloscopia	Cultura Automatizada			
	Positiva	Negativa	Contaminada	Total
Positiva	6,55%	0,53%	-	7,09%
Negativa	9,86%	81,73%	1,33%	92,9%
Total	16,41%	82,26%	1,33%	100%

**Gráfico 2. Comparativo dos métodos de diagnóstico para pesquisa de BAAR em escarro**



Provas de identificação foram realizadas, nas 428 amostras com cultura positiva, a partir do cultivo recente em meio solidificado. O método de identificação disponível no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto propicia apenas a diferenciação do Complexo *M. tuberculosis* das micobactérias não tuberculosas (MNT), não especificando de qual espécie se trata. Os números obtidos no ano de 2009 permitem a quantificação expressa no Gráfico 3.

**Gráfico 3. Resultado da Identificação das Micobactérias no HCFMRP-USP**



## 5. DISCUSSÃO

Há muitos anos a baciloscopia vem sendo indicada como base e principal forma de diagnóstico da tuberculose, constituindo para alguns uma forma quase exclusiva de rastreamento entre os sintomáticos respiratórios. O Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias do ano de 2008 diz que, apesar dos avanços tecnológicos na micobacteriologia, a baciloscopia, corada pelo método de Ziehl-Neelsen e seguindo técnica padronizada de observação ao microscópio de campo claro, mesmo sendo um método de simples execução, continua sendo particularmente importante no combate da tuberculose por ser de baixo custo e por detectar casos bacilíferos, ou seja, casos infecciosos de tuberculose pulmonar, responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão.

A bacteriologia tradicional permanece com validade em regiões de poucos recursos e também, onde são escassos os casos. Nos grandes centros urbanos, onde de fato se avoluma a incidência e prevalência da tuberculose e, especialmente, nas unidades de referência, onde se concentram as complicações, os diagnósticos mais difíceis, as condutas terapêuticas diferenciadas, sejam pelo perfil de resistência ou pelas adversidades medicamentosas, pelas associações de risco dentre outras dificuldades, a baciloscopia isolada não é suficiente. Existe a necessidade de recursos laboratoriais mais confiáveis e mais rápidos que respondam a demanda.

De certa forma, os avanços nos métodos diagnósticos ocorreram pela reemergência da tuberculose nos países avançados, que detêm os recursos técnicos para o seu desenvolvimento, forçados pela necessidade de resultados rápidos e precisos, especialmente frente à necessidade de procedimentos com a emergência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. A introdução desses métodos na prática rotineira, entretanto deve passar sempre pela comprovação da sua aplicabilidade numa determinada região, especialmente nos países em desenvolvimento, definindo seu rendimento em relação aos padrões em uso e seu custo benefício (KRITSKI, 1999).

Os resultados das análises das 1877 amostras de escarro foram estatisticamente significativos com percentuais de positividade de 16,40% para a cultura automatizada e 7,08% para a baciloscopia. Esses dados demonstram uma maior sensibilidade do método automatizado quanto comparado a baciloscopia. Resultados semelhantes foram encontrados por Presslich *et al.*, quando em 802 amostras analisadas 13,6% foram positivas pelo sistema BACTEC e 11,3% pelo sistema convencional.

Outra importante constatação foi a significativa redução do tempo médio de detecção das micobactérias com a implantação do sistema automatizado em relação à cultura no LJ, adotada como padrão.

Assim, foi avaliado o rendimento do sistema automatizado BacT/Alert 3D, em uma unidade de referência, com alta demanda de pacientes com diagnósticos complicados e com problemas terapêuticos de diversas ordens, comparando-o ao método tradicional em uso, à baciloscopia para bacilos álcool-ácido resistentes. Os dados obtidos ratificaram a implantação deste sistema no laboratório de micobacteriologia do HCFMRP-USP.

Através da análise dos dados relacionados à identificação das micobactérias presentes nos escarros analisados observamos que 74% das micobactérias foram identificadas como *M. tuberculosis*. Segundo consta na literatura especializada as micobactérias não tuberculosas (MNT) apresentam diferentes potenciais de patogenicidade para a espécie humana, e incidem com frequência variável em determinados tipos de amostras biológicas de pacientes com suspeita de infecção (WOLINSKY,1984).

Parece-nos pertinente diante deste resultado reafirmar que a comprovação da participação das MNT como agentes etiológicos de doenças ou lesões progressivas deve ser feita através da correlação entre os achados clínicos e os laboratoriais. Os critérios diagnósticos adotados pela American Thoracic Society para diagnóstico de infecções causadas por MNT enfatizam o isolamento da mesma espécie em múltiplas amostras para pacientes imunocompetentes (ATS, 2007). Sendo assim, seriam necessárias pelo menos três amostras de escarro (ou outros espécimes de sítios não estéreis) com duas culturas positivas e uma baciloscopia positiva coletadas num período de um ano.

Entretanto, as doenças causadas pelas MNT aumentaram em todo o mundo no período pós-AIDS. Estudos realizados nos Estados Unidos e na Europa relataram 25% a 60% de infecções por MNT entre pacientes portadores de HIV (ADLE-BIASSETTE, 2003). Assim, se porventura a cultura de escarro solicitada identificar uma MNT, mesmo que a rigor não confirmado laboratorialmente pelos critérios da ATS ou qualquer outro a ser adotado, é pouco provável que este resultado seja desprezado e não implique numa conduta terapêutica específica. Assim, para pacientes imunossuprimidos basta o quadro clínico e 1 cultura positiva para que se estabeleça o diagnóstico por uma MNT.

## 6. CONCLUSÕES

- O Trabalho demonstrou uma maior sensibilidade da cultura pelo método automatizado seguida de semeadura em Lowenstein-Jensen, em comparação à baciloscopia no diagnóstico da tuberculose.
- A sensibilidade da cultura justifica sua adoção em unidades para pacientes com problemas mais complexos e, para assistência e seguimento de tuberculosos.
- A alta prevalência de micobactérias não tuberculosas nos pacientes do Hospital das Clínicas da FMRP-USP decorre provavelmente desta instituição estar voltada para assistência médica de nível terciário, envolvendo pacientes com AIDS, transplantados e outras formas de imunossupressão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLE-BIASSETTE, H. Les mycobactéries non tuberculeuses. **Annales de Pathologie**, vol. 23, n. 3, p. 216-35, 2003.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine** 175:367-416, 2007.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. The official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention (CDC) and the Council of the infectious Disease Society of America. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 161:1376-95, 2000.

BATISTA, R.S; GOMES, A. P.; IGREJA, R. P.; HUGGINS, D.W. **Medicina Tropical**. Abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Ed. Cultura Médica, Capítulo 62-1: 593-610, 2001.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de políticas de saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o Controle de Tuberculose**. Brasília; 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias**. Brasília, DF, 2008.

BROOKS, G.F; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N.; JAWETZ,E.; MELNICK, J.L.; ADELBREG, E.A. **Medical Microbiology**, 20° Ed., 2005.

CASTELO FILHO, A.; KRISTKI, A.L.; BARRETO, A.W.; LEMOS A.C.M.; RUFFINO, A.; GUIMARÃES, C.A. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**,2004; 30 (Supl.1):S2-56.

DE GRACIA, J.; CURULL,V.; VIDAL, R.; RIBA,A.; ORRIOLS, R.; MARTIN,N.; MORREL,F. **Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in suspected pulmonary tuberculosis**.*Chest*,93(2):329-32,1988.

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA. Disponível em:< <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 3 de Out. 2010.

DORRONSORO, I.; MARTIN, C.; CABODEVILLA, B.; OJER, M.; RUZ, A. **Effect of the number of samples studied on the diagnosis of tuberculosis**. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 2000; 18(5): 215-8.

DYE, C & FLOYD, K. **Chapter 16: Tuberculosis.Disease Control Priorities in Developing Coutries**. Jamison, D.T.;Mosley, H.W.;Measham, A.R. 2° Ed. Washington D.C.,2006.

EISENSTADT, J., HALL, G.S. Microbiology and classification of Mycobacteria. **Clinics in Dermatology**, v.13, n.3, p.97-206, 1995.

EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE NO BRASIL E NO MUNDO. Disponível em :< <http://www.saude.ba.gov.br>>. Acesso em: 14 de Out. 2010.

FINCH, D.; BEATY, C.D. **The utility of a single sputum specimen in the diagnosis of tuberculosis.** Comparison between HIV-infected and non-HIV-infected patients. *Chest*,111(5):1174-9,1997.

HOBBY, G.L.; HOLMAN, A.P.; ISEMAN,M.D.;JONES,J.M. **Inumeracion of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4:94-104, 1973.

KRISTSKI A.L.; CONDE M.B.; SOUZA G.R.M.**Tuberculose:** do ambulatório a enfermaria. São Paulo, Ed. Atheneu, 1999.

KRITSKI, A.L.; RUFFINO, A. Health sector reform in Brazil: Impact on tuberculosis control. **Internacional Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, 4:622-26, 2000.

MANUAL DE RECOMENDAÇÕES PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE NO BRASIL. Disponível em < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual de recomendacoes controle t b\\_novo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tub_novo.pdf)>. Acesso em 10 de Set. 2010.

MELLO,F.C.; BASTOS,L.G.; SOARES,S.L.; REZENDE,V.M.; CONDE,M.B.;CHAISSON,R.E.;KRITSKI,A.L.; RUFFINO-NETO,A.;WERNECK, G.L. Predicting smear negative pulmonary tuberculosis with classification trees and logistic regression: a cross-sectional study.**BMC Public Health**, 23;6:43,2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Centro de referência Prof. Helio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da Tuberculose:** uma proposta de integração ensino-serviço, 5°. ed. Rio de Janeiro, 2002.

MORRONE, N. Diagnosis of tuberculosis in individuals with respiratory symptoms. Commentary on the II Guidelines of the Brazilian Society of Pulmonology and Phthisiology and the Ministry of Health **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, vol.31 no.4. São Paulo, 2005.

NELSON, S.M.; DEIKE, M.A.; CARTWRIGHT,C.P.Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(2):467-9, 1998.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples. **Journal of Microbiology**, 41(12): 5355-65, 2003.

PRESSLICH, J.; LAHOUNIK, E.; KRAUS, G. The Bactec-System in the diagnosis of tuberculosis: comparison of a conventional and the radiometric method (Bactec) for culturing, differentiation and susceptibility testing of mycobacteria. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg**, 270(4): 487-91, 1989.

ROSEMBERG, J. **Tuberculose: Panorama Global. Óbices para o seu controle.** Fortaleza: Secretaria de Estado de Saúde do Ceará, 1999.

SINGH, M.; ESPITIA, C. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. **PROTEOMICS**, Volume 7, Issue 18, pages 3332–3341, No. 18, 2007

SEPKOWITZ, K.A.; RAFFALLI, J.; RILEY, L.; KIEHN, T.E.; ARMSTRONG, D. **Tuberculosis in the AIDS era.** *Clinical Microbiology*, 8:180-99, 1995.

STEINGART, V. K.; HENRY N.G.; HOPEWELL M. P.; RAMSAY, A.; CUNNINGHAM, J.; URBANCZIK, R.; PERKINS, M.; AZIZ, M.; PAI, M. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, Volume 6, Issue 10, Pages 664-674, 2006.

SUDRE, P.; TEN DAM, G.; KOCHI, A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull WHO*; 70:149-59, 1992.

TORTOLI, E.; PALOMINO, J.C. Chapter 14: New Diagnosis Methods. From basic science to patient care. J.C. PALOMINO; S.C. LEÃO E V. RITACCO. [www.tuberculosistextbook.com](http://www.tuberculosistextbook.com), 2007

WALLACE, J.R.; GLASSROTH, J.; GRIFFITH, D.E.; OLIVIER, K.N.; COOK, J.L.; GORDIN, F. Diagnosis and Treatment of diseases caused by nontuberculous mycobacteria. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 1997; 156 (supl):S 1-25.

WAYNE, L.G. **The mycobacteria: a sourcebook**, part B. New York, P.1.141-1.207, 1984.

WOODS, G.L.; BERGMANN, J.S.; WILLIAMS-BOUYER, N. Clinical Evaluation of the Gen-Probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in select nonrespiratory specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, 39 (2):747-9, 2001.

WOLINSKY, E; KUBICA, G.P. Non-tuberculous mycobacteria and associated diseases. In: KUBICA, G.P. & WAYNE, L.G. (eds.). **The mycobacteria: a sourcebook, part B**. New York, p.1.141-1.207, 1984.