

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

MARIA DE FÁTIMA FILARDI OLIVEIRA MANSUR

**AVALIAÇÃO DE TESTES FENOTÍPICOS DE CEPAS DO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FRENTE AOS
ANTITUBERCULOSOS, ISOLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM
HOSPITAL GERAL, BELO HORIZONTE, BRASIL**

**Belo Horizonte
2011**

MARIA DE FÁTIMA FILARDI OLIVEIRA MANSUR

**AVALIAÇÃO DE TESTES FENOTÍPICOS DE CEPAS DO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FRENTE AOS
ANTITUBERCULOSOS, ISOLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM
HOSPITAL GERAL, BELO HORIZONTE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do grau de Mestre.

Área de Concentração: Ciências Clínicas

Orientadora: Prof^a Silvana Spíndola de Miranda

Coorientadora: Prof^a Wânia da Silva Carvalho

**Belo Horizonte
2011**

Mansur, Maria de Fátima Filardi Oliveira.
M289a Avaliação de testes fenotípicos de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* frente aos antituberculosos, isoladas de pacientes atendidos em hospital geral, Belo Horizonte, Brasil [manuscrito]. / Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur. -- Belo Horizonte: 2011.
85f.: il.
Orientadora: Silvana Spindola de Miranda.
Co-Orietadora: Wânia da Silva Carvalho.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Testes de Sensibilidade Microbiana. 3. Tuberculose. 4. Antituberculosos. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Miranda, Silvana Spindola de. II. Carvalho, Wânia da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLN: WF 200

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora

Prof^a Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Francisco José Pena

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina

Prof^a Teresa Cristina Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Prof^a Anelise Impelziere Nogueira

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Prof^a Teresa Cristina Abreu Ferrari

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Prof^a Valéria Maria de Azeredo Passos

Colegiado do Programa de Pós-Graduação Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Prof^a Teresa Cristina Abreu Ferrari

Prof^a Valéria Maria de Azeredo Passos

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof^a Suely Meireles Rezende

Prof. Francisco Eduardo Costa Cardoso

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Representantes discentes:

William Pedrosa Lima (Titular)

Pollyanna Barros Batista (Suplente)

Às minhas filhas, Vitória e Beatriz, por me fazer entender o verdadeiro amor, obrigada por estarem sempre comigo, presentes da VIDA.

Ao meu amor Eduardo, pela compreensão e apoio irrestrito, por estar sempre ao meu lado. Seu carinho e atenção me confortam.

À minha querida MÃE, por tudo. Sua sabedoria e seu amor são sempre fundamentais. Muito obrigada!

Ao Dr. José Lucciola, meu mestre. Seus ensinamentos fazem parte desta jornada e continuarão por toda minha vida.

Aos meus irmãos e irmãs, minha base para a vida.

AGRADECIMENTOS

À Profª Silvana Spíndola de Miranda, pelo apoio, confiança e incentivo à pesquisa.

À Profª Wânia da Silva Carvalho, pelo carinho e atenção.

Ao Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina/UFMG pelo apoio na realização deste projeto e à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo apoio e incentivo a pesquisa em Minas Gerais.

Ao Cláudio José Augusto-FUNED (Fundação Ezequiel Dias), por ter cedido as cepas de proficiência do *Mycobacterium tuberculosis*.

Ao Laboratório de Microbiologia da Unidade Funcional-Patologia Medicina Laboratorial, à Coordenadora do Setor de Microbiologia, Farmª Bioquímica, Luciana Tavares Oliveira, pela compreensão e apoio.

Às pessoas que me incentivaram para o estudo em Microbiologia, Profª Júlia dos Anjos, Profª Tânia Ceres, ao Dr. Marcus Gontijo “Jabuti”, a Bioquímica Jória de Castro, a Maria das Graças, a Drª Lúcia Cançado Paraíso e a colega Lucienne França Reis Paiva pelo caminho que percorremos juntas pelo mundo apaixonante da Microbiologia.

Aos meus colegas e equipe da Microbiologia, pelo respeito e incentivo. Meu muito obrigado a Patrícia e Vera Regina, pela força nesta caminhada.

Aos alunos da iniciação científica Raquel e Lucas, e a todos os alunos que participaram deste estudo.

Às minhas amigas de todos os momentos Flávia Yankous, Simone Gonçalves e Cláudia Sampaio.

À toda minha família por todos os momentos juntos e pelo suporte emocional.

RESUMO

A tuberculose (TB) permanece como uma das principais causas de mortalidade e morbidade em humanos em todo o mundo. O surgimento de cepas multi-drogas resistentes (TBMDR) e a associação com a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tornou a situação epidemiológica da TB mais grave. Em hospitais de alta complexidade há necessidade urgente de ações que possibilitem a rápida identificação de pacientes bacilíferos, assim como realizar testes diagnósticos para estudo de sensibilidade que sejam rápidos, acurados e de fácil execução e baixo custo para conhecer o perfil das cepas dos pacientes atendidos no hospital e diante da detecção de TBMDR, evitar a sua disseminação para que seja evitada sua disseminação. Este estudo avaliou o desempenho do teste de NRA (*Nitrate Reductase Assay*), do REMA *Resazurin Microtiter Assay Plate* e MTT *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* em cepas do *M. tuberculosis* frente às drogas anti-tuberculosas à rifampicina (R), isoniazida (H), estreptomicina (S) e etambutol (E). O Método das Proporções (MP) foi utilizado como método referência. Foram avaliadas 57 cepas do *M. tuberculosis*, 43 isoladas de pacientes e 14 cepas de proficiência para o método NRA. Para os métodos MTT e REMA foram utilizadas as 14 cepas de proficiência frente a R e H, respectivamente. Os resultados do NRA foram: 100% de concordância com o MP para R e H. Os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) para R e H foram de 100%, os VPP e VPN de S e E foram de 88,9 e 100% e 98 e 98,2% respectivamente e kappa de 0,87 (muito boa concordância) para S e 0,79 (boa concordância) para E. Com relação aos métodos MTT e REMA algumas adequações serão necessárias para alcançar melhor desempenho. O tempo médio para obtenção dos resultados dos três testes avaliados foi de 10 dias. O método NRA, REMA e MTT constituem ferramentas laboratoriais importantes pela sua rapidez, baixo custo constituindo-se alternativa para implantação em laboratórios de países com escassez de recursos.

Palavras-chave: *M. tuberculosis*; testes de sensibilidade; NRA; MTT; REMA

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains as one of the major causes of infectious mortality and morbidity in humans, all over the world. The appearance of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) strains associated with TB/HIV co-infection has become this one, a preoccupying situation. Within high complexity hospitals, there is an urgent need for actions enabling the fast identification of tuberculosis smear-positive patients, as well as options offering diagnostic tests for susceptibility studies that are quick, accurate, and of easy execution and low cost, to be applied in the determination of the profile of strains present in the patients assisted by the hospital and, in case of MDR-TB detection, to avoid their dissemination and contribute for the epidemiological surveillance. This study has evaluated the performance of the NRA (*Nitrate Reductase Assay*), REMA (*Resazurin Microplate Assay*), and MTT (3-[4.5-dimethylthiazol-2-yl]-2.5-diphenyltetrazolium bromide) tests over strains of *M. tuberculosis*, facing the antituberculous: Rifampin (R); Isoniazide (H); Streptomycin (S); Ethambutol (E). The Proportions Method (PM) was utilized as a reference method. We evaluated 57 strains of *M. tuberculosis* isolates from 43 patients and 14 strains of proficiency for the NRA method. For the MTT and REMA methods were used 14 strains of proficiency compared to R and H, respectively. The results of the NRA were: 100% agreement with the MP for R and H. The positive predictive value (PPV) and negative (NPV) for R and H were 100%, the PPV and NPV of S and E were 88,9 and 100% and 98 and 98,2% respectively and kappa of 0,87 (very good agreement) for S and 0,79 (good agreement) to E. With regard to the methods MTT and REMA some adjustments needed to achieve better performance. The average time for results collection with the three assessed tests was of 10 days. The NRA, REMA, and MTT methods are important laboratory tools thanks to their quickness and low cost; being also useful alternatives for laboratories implementation in countries with resources scarcity.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; susceptibility tests; NRA; MTT; REMA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AhpC	gene associado à resistência de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>M. tuberculosis</i>) frente a isoniazida
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	Auramina
β	beta
B.A.A.R	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
C	Citosina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DFC	Dose Fixa Combinada
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOTS	<i>Directly Observed Treatment, short-course</i>
E	Etambutol
<i>emB</i>	gene associado à resistência do <i>M. tuberculosis</i> frente ao etambutol
G	Guanina
7H9	Meio líquido Middlebrook 7H9
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> -Vírus da Imunodeficiência Humana
IUATLD	“ <i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i> ”
<i>kasA</i>	gene associado à resistência de <i>M. tuberculosis</i> frente a isoniazida
<i>katG</i>	gene associado à resistência de <i>M. tuberculosis</i> frente a isoniazida
KNO ₃	Nitrato de pótassio
LJ	Löwenstein-Jensen
MDR	Multidroga-resistente
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MG	Minas Gerais

MGIT	Tubo Indicador de Crescimento para Micobactérias
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MS	Ministério da Saúde
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standard</i>
NRA	<i>Nitrate Reductase Assay</i>
OADC	Ácido Oléico-Albumina-Dextrose Catalase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCTB	Programa de Controle da Tuberculose
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
R	Rifampicina
REMA	<i>Resazurin Microtiter Assay Plate</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
<i>rpoB</i>	gene associado à resistência de <i>M. tuberculosis</i> frente a rifampicina
<i>rpsL</i>	gene associado à resistência de <i>M. tuberculosis</i> frente a estreptomicina
<i>rrs</i>	gene associado à resistência de <i>M. tuberculosis</i> frente a estreptomicina
S	Estreptomicina
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
TS	Teste de Sensibilidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR	<i>M. tuberculosis</i> extensivamente resistente
Z	Pirazinamida
ZN	Zielh-Neelsen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da taxa de incidência de tuberculose (casos por 100.000 hab). Brasil, 2007	19
Figura 2 - Estrutura da parede celular das micobactérias	21
Figura 3 - Resistência aos anti-tuberculosos no mundo.....	22
Figura 4 - Países com casos confirmados de TBXDR.....	23
Figura 5 - Bacilos de <i>M. tuberculosis</i> corados pelo método de Ziehl-Neelsen	31
Figura 6 - Colônias de <i>M. tuberculosis</i> em ágar de LJ após oito semanas de incubação	32
Figura 7 - Reação de redução do Nitrato a Nitrito - Reação de Griess.....	35
Figura 8 - Método MTT	66
Figura 9 - Método REMA.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Esquema de tratamento para TBMDR: os esquemas são classificados em cinco grupos	30
Quadro 2 - Perfis de sensibilidade das cepas de referência de <i>M. tuberculosis</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frequência de mutantes resistentes x droga	26
Tabela 2 -	Genes micobacterianos associados com mutações de resistência aos antituberculosos de 1ª linha	27
Tabela 3 -	Resultados dos MICs de isoniazida e rifampicina pelo método MT.....	64
Tabela 4 -	Resultados dos MICs de isoniazida e rifampicina pelo método REMA	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Epidemiologia	18
1.2 Agente Etiológico	20
1.3 Transmissão	21
1.4 Vigilância de Resistência às Drogas	22
1.5 Mecanismos de Ação de Drogas Anti-tuberculosas.....	24
1.5.1 Rifampicina (R)	24
1.5.2 Isoniazida (H)	25
1.5.3 Estreptomicina (S)	25
1.5.4 Etambutol (E)	25
1.6 Mecanismos de Resistência aos Anti-tuberculosos pelo <i>M. tuberculosis</i>.....	26
1.6.1 Análises Genéticas e Moleculares	27
1.6.1.1 Rifampicina	27
1.6.1.2 Isoniazida.....	28
1.6.1.3 Estreptomicina	28
1.6.1.4 Etambutol	28
1.7 Tratamento.....	28
1.8 Diagnóstico Laboratorial	31
1.8.1 Microscopia-baciloscopia.....	31
1.8.2 Cultura	31
1.8.3 Testes de Sensibilidade.....	32
1.8.3.1 Método das Proporções em Meio LJ	34
1.8.3.2 Métodos Automatizados	34
1.8.3.3 Métodos Colorimétricos	35
1.8.3.3.1 Método NRA	35
1.8.3.3.2 Métodos REMA E MTT	37
2 JUSTIFICATIVAS.....	38

3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4 ARTIGO sob o Título: AVALIAÇÃO DE TESTE DE SENSIBILIDADE UTILIZANDO O MÉTODO “NITRATE REDUCTASE ASSAY” (NRA) EM CEPAS DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, ISOLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM UM HOSPITAL GERAL, BELO HORIZONTE, BRASIL.....	41
5 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS	58
5.1 Critérios de inclusão.....	58
5.2 Critérios de exclusão	58
5.3 Preparo das soluções testes	58
5.3.1 NRA.....	58
5.3.2 REMA e MTT	59
5.4 Preparo do inóculo	60
5.5 Suspensão de uso.....	60
5.6 Preparo da solução estoque de drogas.....	60
5.7 Diluições das drogas	61
5.8 Preparo da solução reveladora.....	61
5.9 Preparo da microplaca.....	61
5.10 Concentrações utilizadas das drogas e <i>cut-off</i>	62
5.11 Interpretação dos resultados	62
5.12 Cálculos Estatísticos	63
6 RESULTADOS MÉTODOS MTT e REMA	64
7 DISCUSSÃO	67
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70

9 PERSPECTIVAS.....	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	78
Anexo A - Pareceres Éticos.....	78
Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	81
Anexo C - Ata de defesa de dissertação de mestrado	82
Anexo D - Declaração de aprovação	83
APÊNDICE	84
Apêndice A – Questionário	84

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é doença infecciosa causada pelo complexo de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), constituído pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* – BCG, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (MS, 2008) e foi descrita como “a praga branca” ainda no século 15. Sua etiologia e patogênese ficaram desconhecidas por vários séculos, até que seu agente etiológico foi descrito por Robert Koch em 1882, ficando conhecido como bacilo de Koch. O medicamento foi instituído somente na década de 40 com a descoberta da estreptomomicina (S) e posteriormente isoniazida (H), etambutol (E) e rifampicina (R) em 1952, 1961 e 1968, respectivamente (INDERLIED; SALFINGER, 1999).

A TB permanece como um importante problema de saúde pública mundial, agravado pelo surgimento de resistência a fármacos de primeira linha isoniazida (H); rifampicina (R); etambutol (E); pirazinamida (Z); estreptomomicina (S), além da multidroga-resistência (MDR - cepas do *M. tuberculosis* resistentes a pelo menos H e a R), e mais recentemente pela tuberculose extensivamente resistente (XDRTB) em que se observam, cepas do *M. tuberculosis* resistente a H, R, a uma fluorquinolona, e pelo menos a um dos três medicamentos injetáveis de segunda linha: amicacina (A), canamicina (K), ou capreomicina (NOTICE, 2006).

A prevalência TB tornou-se mais expressiva com a emergência da pandemia pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). Essa co-infecção torna a doença mais agressiva, dificultando o tratamento, pois há menor absorção dos medicamentos e intensificação da imunossupressão agravada pela TB. Nesses pacientes, a evolução da doença é mais rápida e seu diagnóstico normalmente é mais tardio. Os portadores do HIV possuem 10 vezes risco de desenvolver TB quando comparados com a população sem este vírus, no primeiro ano após infecção. (KONEMAN *et al.*, 2008; WELLS, 2010). Em 1993, Frieden e colaboradores estudaram as características de pacientes com TB na cidade de Nova Iorque no ano de 1991. Observaram nos perfis de resistência, que a TBMDR representou 19% dos casos de TB e a maioria destas cepas foram adquiridas principalmente dentro dos hospitais, e os usuários de drogas injetáveis e co-infectados com o HIV tinham maiores riscos as albergarem. Este fato chamou a atenção das autoridades mundiais sobre o problema da TB em países desenvolvidos, acompanhado da multi-droga resistência e associada aos pacientes portadores do HIV. Em 1994, a Organização Mundial de Saúde

(OMS) declarou TB emergência mundial em países desenvolvidos e em 2006 definiu a TBMDR e TBXDR, como novos perfis de resistência. Em outro estudo realizado a partir de surto em hospital na África do Sul foi descrita uma situação alarmante de TBXDR. Entre 221 pacientes com TBMDR, 53 (23,9%) foram caracterizadas como TBXDR, sendo que 55% nunca tinham sido submetidos ao tratamento para TB, e 67% tiveram admissão hospitalar recente. Entre os 53 pacientes com TBXDR, 44 (83%) apresentavam-se co-infectados pelo HIV e 52 (98%) evoluíram a óbito, com média de 16 dias a partir da data do diagnóstico mesmo com o tratamento anti-retroviral e invariavelmente antes da chegada da resposta do laboratório que confirmou o diagnóstico de TBXDR. Estudos de genotipagem indicaram que 85% das cepas XDR eram similares, demonstrando que houve transmissão dessas cepas entre os pacientes. (GANDHI *et al.*, 2006).

Esses exemplos ilustram a gravidade e a ocorrência de cepas TBMDR/XDR em países desenvolvidos e atualmente principalmente em países em desenvolvimento, acometendo em sua grande maioria pacientes HIV positivos e com transmissão nos hospitais. A transmissão hospitalar e em prisões entre pacientes com AIDS e a ausência de medidas de biossegurança podem reproduzir as características principais de surtos de TBMDR e TBXDR como os ocorridos na África do Sul e nos EUA, além de outros relatos no leste europeu. O risco de transmissão dessas cepas para profissionais de saúde, e subsequentemente para a população em geral, passaram a ser a grande prioridade mundial para os Programas de Controle da TB, em nível mundial. (KRITSKI, 2010).

Observa-se o agravamento do problema da TB no Brasil, embora o Ministério da Saúde tenha adotado a terapia diretamente observada (*DOTS*). Essa constatação tem sido atribuída, em parte, ao aumento da pobreza com aglomeração excessiva, à exclusão social, a toxicodependência, e ao descaso de pacientes e do sistema de saúde em relação ao efetivo controle da TB (DALCOLMO *et al.*, 2007; KONEMAN *et al.*, 2008).

1.1 Epidemiologia

A TB é causa significativa de morbidade e mortalidade, principalmente em países com recursos médicos limitados (MURRAY *et al.*, 2006). A magnitude e a relevância desse problema pode ser demonstrada pelos relatórios da OMS, onde as estimativas são de que um terço da população mundial esteja infectada pelo *M. tuberculosis*, reservatório que resulta em 9,4 milhões de novos casos e 1,7 milhões de mortes, em todo o mundo, respectivamente,

sendo 456 mil em pacientes HIV positivos. A incidência mundial é de 140 casos por 100 mil habitantes. As proporções de casos encontram assim distribuídas pelo mundo: Ásia (55%), África (31%), Mediterrâneo Oriental (6%), Europa (5%) e Américas (3%). Os casos novos de TB com HIV positivos são: 1,37 milhões, 15% do total de casos estimados, dos quais 79% estariam na África e 500 mil casos novos de TB multidroga-resistente (TBMDR) (OMS/PNCT, 2010).

Em 2009, no Brasil foram notificados 73 mil casos correspondendo ao coeficiente de incidência de 50/100.000 habitantes, o que o inclui na lista dos 22 países que concentram 80% de todos os casos do mundo, ficando em décimo nono lugar (OMS, 2009). A TB é a quarta causa de morte por doenças infecciosas e a primeira em pacientes HIV positivos. A TB faz cerca de 4.500 vítimas/ano. A estimativa de infectados pelo HIV em 2007 foi de 630.000, com prevalência da infecção de 0,61% e taxa de incidência de 17,8/100.000 habitantes, o que representa uma estimativa de co-infecção TB/HIV de 10% no Brasil (MS/PNCT, 2010; WHO, 2010). Na figura 1 estão representadas as taxas de incidência de TB por 100.000 habitantes de acordo com os estados do Brasil.

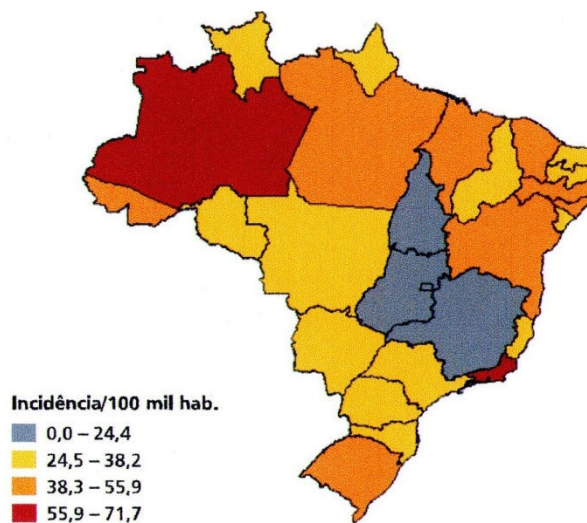


Figura 1 - Distribuição da taxa de incidência de tuberculose (casos por 100.000 hab).
Brasil, 2007

Fonte: *Global Tuberculosis Control 2009*

No Estado de Minas Gerais, houve em média 6085 casos/ano nos últimos seis anos, com coeficiente de incidência de 23 casos/100 mil habitantes, o que representa o quarto menor coeficiente de incidência da região sudeste, e quarto de maior carga de TB no país. O coeficiente de mortalidade por TB foi de 3,0 /100 mil habitantes, o percentual de cura entre os

casos novos foi de 70,2% e o de abandono de tratamento de 8,5%, o que pode contribuir para o aumento de casos de TB resistente (SECRETARIA DE SAÚDE DE MG, 2010).

Em Belo Horizonte, foram notificados em 2009, 1897 casos novos de TB (coeficiente de incidência de 28,88/100.000 habitantes), com taxas de cura de 66,2%, a de abandono do tratamento de 19,7% e 4,3% de óbito. Em estudos recentes no HC/UFMG foi detectada elevada ocorrência de TB resistente (15,3%), similar ao descrito em outras séries que analisaram o perfil de resistência em pacientes atendidos em hospitais. Tais dados sinalizam para a urgente necessidade da introdução de métodos de fenotipagem rápidos, de baixo custo e de elevada eficácia, e que atendam pacientes sob suspeita de TB e/ou TB com outras comorbidades, principalmente portadores do HIV (SPINDOLA DE MIRANDA *et al.*, 2008).

Para que o controle da TB seja efetivo e com resultados que impliquem na diminuição da incidência, a OMS através do Plano Global “STOP TB” 2006-2015, definiu como metas a detecção de pelo menos 70% dos novos casos com baciloscopia positiva e a cura de pelo menos 85% dos casos, com índices de abandono toleráveis de até 5%.

1.2 Agente Etiológico

O gênero *Mycobacterium* consiste em bastonetes aeróbios imóveis, não esporulados e que ocasionalmente formam filamentos ramificados. Sua classificação é baseada na sua ácido-resistência, presença de ácidos micólicos contendo 60 a 90 carbonos clivados por pirólise para formar ácidos graxos metil ésteres C22 a C26 e alta quantidade de guanina mais citosina (G + C) 61% a 71% no DNA. (MURRAY *et al.*, 2006).

A estrutura básica da parede celular das micobactérias é mais complexa que a de outras bactérias; proteínas, manosídios de fosfatidilinositol e lipoarabinomanano (LAM) encontrando-se ancorados na membrana plasmática. A camada de peptidoglicanos forma a base sobre a qual se ligam arabinogalactanos, que são polissacarídeos ramificados formados por D-arabinose e D-galactose. O resíduo terminal de D-arabinose é esterificado, formando ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular, com moléculas glicolípídicas e peptidoglicolípídios. Os componentes lipídicos compõem 60% do peso da parede celular. As proteínas e porinas de transporte estão distribuídas pelas camadas da parede celular, constituindo 15% de seu peso. As proteínas são antígenos biologicamente importantes, estimulando a resposta imune celular do paciente contra a infecção. Outros fatores de

virulência também estão associados, como o fator corda: glicopeptídeo tóxico para as células mamíferas, capaz de inibir a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), assim como a cera D, responsável pela hipersensibilidade tardia. (MURRAY *et al.*, 2006).

Na figura 2 encontra-se desenho esquemático da estrutura da parede celular das micobactérias, mostrando a organização dos seus componentes.

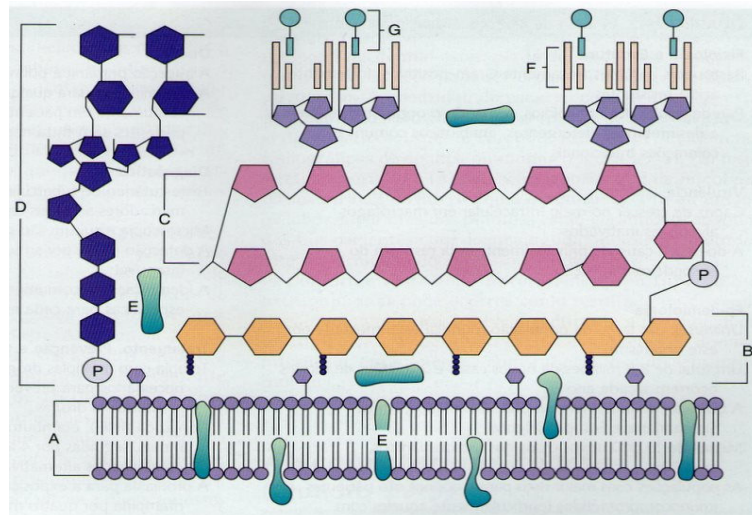


Figura 2 - Estrutura da parede celular das micobactérias
Redesenhado de Karakousis *et al.*; em Cell Microbiol 6:105-116,2004)
Fonte: (MURRAY *et al.*, 2006).

Componentes

A: membrana plasmática

B: peptidoglicanos

C: arabinogalactano

D: lipoarabinoglicano recoberto por manose

E: proteínas associadas à membrana plasmática e à parede celular

F: ácidos micólicos

G: moléculas glicolípídicas de superfície associadas aos ácidos micólicos

1.3 Transmissão

A TB é mais comumente adquirida inalando o *M. tuberculosis*, por via aérea através de partículas muito finas, contendo um a três bacilos, onde alcançam os pulmões, e são geralmente fagocitados por macrófagos nos alvéolos (TORTORA *et al.*, 2000). Os doentes bacilíferos, aqueles cuja baciloscopia do escarro é positiva, são a principal fonte de infecção. A doença irá se estabelecer ou não dependendo do sistema imune celular do indivíduo e da carga bacilar infectante (MURRAY *et al.*, 2006). As formas exclusivamente extra-pulmonares não transmitem a doença (MS, 2010).

1.4 Vigilância de Resistência às Drogas

Consiste em evitar a seleção de *M. tuberculosis* resistente. A mais importante premissa no tratamento da TB. (COLE *et al.*, 1994; DALCOLMO *et al.*, 1999; MITCHISON *et al.*, 1986). Essa tarefa deve ser somada à complexidade da doença *per se* e a dificuldade no manejo do paciente com tratamentos longos e de eficácia menor do que os esquemas convencionais, ao alto custo das drogas e da propedêutica necessária ao acompanhamento do tratamento. O tratamento pode ainda excluir o paciente do mercado de trabalho, na sua idade mais produtiva (DALCOLMO *et al.*, 2007).

A OMS indica como 3,6% a média mundial de resistência, alcançando em algumas regiões do mundo níveis próximos de 10%. Em 2008 aproximadamente 30.000 casos de TBMDR foram notificados, a maioria em países do leste europeu (Rússia), China, Índia e na África do Sul. Para 2009-2010, a OMS espera que haverá um aumento desses casos, pois há estimativas de aumento na China, Índia e Rússia, o que poderá chegar a 490.000 todos os anos, causando mais de 110.000 mortes anualmente (WHO, 2008). Na figura 3, encontra-se a distribuição mundial em porcentagens de TBMDR entre casos novos de TB.

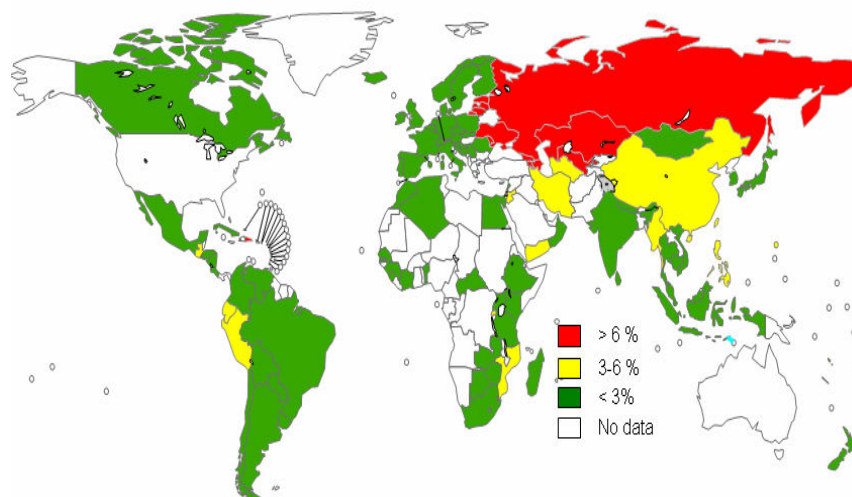


Figura 3 - Resistência às drogas no mundo
% de TBMDR entre casos novos de TB no período de 1994-2007
Fonte: WHO-The STOP TB DEPARTMENT, 2008.

Estudos epidemiológicos de resistência aos anti-tuberculosos fornecem indicadores, como a prevalência da resistência primária e secundária, os quais são úteis na avaliação da qualidade do tratamento e do Programa de Controle da TB (PCTB).

Desde 1994, a OMS e a *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (IUATLD) vêm realizando um Projeto Global de Vigilância da Resistência às Drogas do Tratamento da TB mundialmente. Os resultados do estudo mostraram que *M. tuberculosis* resistente está presente em todas as áreas geográficas estudadas e também apontaram para o problema de TBMDR em regiões do Leste Europeu onde a prevalência é maior que 3% entre os casos novos de TB. Dados de TBXDR já foram relatados em 49 países, porém são representativos em 35 países, onde as taxas de TBXDR variam de 4 a 24% na Armênia e Estônia respectivamente (OMS, 2008).

A figura 4 indica em quais regiões do mundo já foram confirmados e relatados casos de TBXDR.



Figura 4 - Países com casos confirmados de TBXDR

Fonte: WHO/THE STOP TB/TUBERCULOSIS TBMDR & TBXDR/THE 2008 REPORT

Para avaliar a evolução de resistências no Brasil, foi realizado o II Inquérito Nacional de Resistência a Drogas em TB pelo MS/PNC durante dois anos, em 2007 e 2008, no Distrito Federal e em cinco estados do país: Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul, com média de 20 municípios por estado. Os resultados apresentados mostram que do I para o II Inquérito, para R a resistência primária passou de 1,3 para 1,5%, para H de 4,4 a 6,0% e MDR primária de 1,1 para 1,4%, para a resistência secundária os resultados foram: para R passou de 6,6 para 8,0%, para H de 11,3 para 15,3% e para MDR de 7,9 para 7,5%. Os dados deste inquérito referem-se a casos ambulatoriais - nunca tratados e retratados.

Em números absolutos para TBMDR a média anual entre 2002 e 2009 foi de 350 casos novos e a XDR com quatro casos (MS/PNCT, 2010).

No Rio de Janeiro em hospital de referência para tratamento de AIDS as taxas de resistência foram 13% para H, 1,8% para R e 3,6% para H e R. A resistência adquirida ocorreu em 12,5% dos pacientes, resistência inicial teve taxa de 18,4% com forte associação em profissionais de saúde e em 28,8% dos portadores do HIV resistência a pelo menos uma droga (BRITO *et al.*, 2004).

O estado de Minas Gerais é a sétima unidade federativa com maior carga de MDRTB, com 105 casos confirmados ou prováveis (3,28% do país), entre 2002 e 2008, sendo 6,7% em pacientes portadores do HIV (SECRETARIA DE SAÚDE DE MG, 2010).

A resistência primária é observada em pacientes sabidamente não tratados antes ou com menos de 30 dias de tratamento, infectados por fonte doente com forma resistente a uma ou mais drogas; enquanto a adquirida é definida como presença de organismos resistentes a uma ou mais drogas em pacientes tratados para TB por um mês ou mais, sendo que estão inclusos os casos de recidiva, de retorno após abandono e de falência de tratamento possivelmente resultante de uso prévio e inadequado de medicação. (DALCOLMO *et al.*, 2007).

De acordo com o Ministério da Saúde, considera como meta a ser atingida no Brasil a obtenção de diagnóstico rápido de resistência, o que ainda constitui problema relevante, pois é tardio, com tempo médio de 24 meses (MS, 2010).

1.5 Mecanismos de Ação de Drogas Anti-tuberculosas

1.5.1 Rifampicina (R)

É constituída por 3,4-(*metilpiperazinil-iminometilidene*)-rifamicin; introduzida em 1968 como um potente agente anti-TB. A R é ativa contra uma grande variedade de bactérias e outras micobactérias de crescimento lento. É extremamente efetiva contra *M. tuberculosis*, com MIC de 0,1 a 0,2 µg/mL, e com atividade bactericida rápida, eliminando bactérias persistentes (ação esterilizante) (BLANCHARD, 1996).

Atua por intermédio da inibição da transcrição ligando-se à RNA polimerase DNA dependente através da subunidade β e mutações no *locus rpoB* conferem trocas

conformacionais, impedindo uma ligação eficiente do fármaco e consequentemente, a resistência. (INDERLIED; SALFINGER, 1999; ROSSETTI *et al.*, 2002).

1.5.2 Isoniazida (H)

É antimicrobiano sintético introduzido em 1952 para o tratamento da TB. Altamente específico e potencialmente bactericida contra todas as cepas selvagens. (INDERLIED; SALFINGER, 1999).

Seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido, mas seu efeito primário se dá na síntese do ácido micólico. Promove a desnaturação de ácidos graxos de cadeias longas e a interrupção do aumento de ácidos graxos e de hidroxilípidios. É pró-droga que atua após ativação pela catalase-peroxidase micobacteriana. A resistência do *M. tuberculosis* à H associa-se com perda da atividade da catalase. É ativo contra micobactérias que estão se replicando ativamente. Possui relativamente aos outros anti-tuberculosos menos efeito tóxico. O MIC é muito baixo, o que contribui para sua eficácia (0,02-0,05 µg/mL) (INDERLIED; SALFINGER, 1999; MURRAY *et al.*, 2009; ROSSETTI *et al.*, 2002).

1.5.3 Estreptomicina (S)

Os aminoglicosídeos são bactericidas pela capacidade de se ligarem irreversivelmente aos ribossomos. Este mecanismo acontece através da inibição da etapa da pré-translocação da síntese protéica por bloqueio da ligação do aminoacyl- t RNA. (INDERLIED; SALFINGER, 1999).

1.5.4 Etambutol (E)

É potente composto anti-tuberculostático, introduzido no tratamento da TB em 1961. O seu mecanismo primário de ação depende da inibição bacteriostática da síntese da parede celular, com efeito específico sobre a síntese da arabinogalactana. (INDERLIED; SALFINGER, 1999; ROSSETTI *et al.*, 2002).

1.6 Mecanismos de Resistência aos Anti-tuberculosos pelo *M. tuberculosis*

As micobactérias são caracterizadas por um envelope celular altamente hidrofílico que atua como barreira de permeabilidade para muitos componentes (MURRAY, 2006), e possui um sistema de efluxo de drogas bem desenvolvido (COLE, 1994). A micobactéria também produz enzimas hidrolíticas ou droga-modificadoras como β -lactamases, aminoglicosídeo acetil transferases, que estão entre os fatores que podem explicar a resistência natural de muitas espécies de micobactérias (MURRAY *et al.*, 2006; TELENTI *et al.*, 1993). A resistência é também um fenômeno fundamentalmente associado a uma grande população bacteriana. (INDERLIED; SALFINGER, 1999; KONEMAN *et al.*, 2008). O *M. tuberculosis* apresenta apenas a mutação como aquisição de resistência dentre as diversas formas de resistência que podem adquirir os microorganismos, que cepas selvagens desenvolvem como fruto de sua multiplicação contínua, fazendo com que alguns bacilos se modifiquem geneticamente, o que caracteriza a resistência natural (ROCHA *et al.*, 2008).

A cepa TB multi-droga resistente é consequência da ação de antimicrobianos que determina uma pressão seletiva para os organismos resistentes tornarem-se predominantes, especialmente quando há grande carga bacilar em lesão cavitária (KONEMAN *et al.*, 2008; MS, 2008). A resistência às drogas em TB, portanto resulta da inter-relação do fenômeno da mutação espontânea e da pressão seletiva, como consequência de tratamento irregular e inadequado (DALCOLMO *et al.*, 2007; MS, 2008).

Na tabela 1 encontra-se a frequência de mutantes resistentes em relação aos principais anti-tuberculosos utilizados no tratamento da TB.

Tabela 1: Frequência de mutantes resistentes x droga

Droga	Resistência natural
Rifampicina	1 mutante resistente a cada 10^{7-8} bacilos
Isoniazida	1 mutante resistente a cada 10^{5-6} bacilos
Etambutol	1 mutante resistente a cada 10^{5-6} bacilos
Streptomomicina	1 mutante resistente a cada 10^{5-6} bacilos

Adaptado de Canetti, *et al.* (1969).

1.6.1 Análises Genéticas e Moleculares

Análises genéticas e moleculares de bacilos resistentes sugerem que a resistência é usualmente adquirida por alterações no alvo da droga como consequência de mutações no gene que o codifica. Durante a exposição do *M. tuberculosis* à droga, existe uma pressão seletiva para mutantes resistentes. As linhagens MDR surgem de sequência de mutações nos diferentes genes envolvidos em cada uma das drogas (ROSSETTI *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 1992).

Tabela 2: Genes micobacterianos associados com mutações de resistência aos anti-tuberculosos de primeira linha

Droga anti-tuberculosa	Espécie	Genes	% resistência	Produto
R	Mtb	<i>rpoB</i>	96-100	β subunidade de RNA polimerase
H	Mtb	<i>katG</i>	42-58	catalase-peroxidase
		<i>ahpC</i>	10-15	sub-unidade de alquil
		<i>inhA</i>	21-34	Hidroperóxido redutase
		<i>kasA</i>	não estabelecido	β-cetoacil-ACP sintase
E	Mtb	<i>embCAB</i>	47-65	Arabinosiltransferase
S	Mtb	<i>rpsL</i>	52-59	Proteína ribossomal S12
		<i>rrs</i>	8-21	16S rRNA

Fonte - INDERLIED; SALFINGER, 1999; ROSSETTI *et al.*, 2002.

1.6.1.1 Rifampicina

A caracterização do gene *rpoB* em *Escherichia coli* demonstrou que a R interage especificamente com a subunidade β da RNA polimerase e que mutações no *locus rpoB* conferem trocas conformacionais, impedindo ligação eficiente da droga e, conseqüentemente, a resistência (WILLIANS *et al.*, 1994). A resistência à R dificilmente ocorre de forma isolada. Na maioria dos casos, associa-se a outras drogas, principalmente à H. A resistência à R pode ser considerada nesse contexto como marcador para TBMDR. (VARELDZIS *et al.*, 1994; INDERLIED; SALFINGER, 1999; ROSSETTI *et al.*, 2002).

1.6.1.2 Isoniazida

A resistência para H parece associar-se à vários tipos de mutações que afetam um ou mais genes (tabela 2), como os que codificam a catalase-peroxidase (*katG*) (ZANG *et al.*, 1992) a enzima enoyl-ACP redutase, envolvida na biossíntese do ácido micólico (*inhA*), a alkyl hidroperóxido redutase, envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (*ahpC*) e a enzima β -ketoacyl ACP syntase (*kasA*). As mutações nos genes *katG*, *inhA* ou *ahpC*, não ocorre em pequena proporção de linhagens H resistentes, indicando o envolvimento de outros genes com esta resistência. (HEYM *et al.*, 1993; INDERLIED; SALFINGER, 1999; ROSSETTI *et al.*, 2002).

1.6.1.3 Estreptomicina

A resistência à S ocorre por mutações no alvo da droga, mais especificamente nos ribossomos. O principal sítio de mutação é o gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12, em que ocorrem mutações que resulta na substituição de um único aminoácido. Outro mecanismo decorre de alterações no gene que codifica o RNA 16S (*rrs*) em duas regiões diferentes. Existe ainda outro mecanismo que pode estar relacionado à entrada do fármaco para o interior da célula bacteriana. (INDERLIED; SALFINGER, 1999; ROSSETTI *et al.*, 2002).

1.6.1.4 Etambutol

As bases genéticas para a resistência para E estão associadas a alterações no gene *embB* encontrado em 70% dos isolados à ela resistentes. Foram encontradas mutações em múltiplos códons que resultaram em dois, três ou quatro aminoácidos diferentes na proteína *embB* (INDERLIED; SALFINGER, 1999; ROSSETTI *et al.*, 2002).

1.7 Tratamento

O conhecimento da proporção da resistência natural é importante na instituição do tratamento da TB para evitar seleção de bacilos resistentes. Em um paciente com TB pulmonar, existem três populações de micobactérias localizadas extracelularmente em cavidades abertas, intracelularmente nos macrófagos e em lesões caseosas fechadas. (KONEMAN *et al.*, 2008).

A S é a droga mais eficaz para agir sobre os bacilos extracelulares em divisão ativa nas cavidades, porém tem pouco efeito em lesões caseosas fechadas. A H é ativa contra todas as micobactérias que se dividem rapidamente e as de divisão lenta intramacrofágicas. A R é eficaz contra todos esses grupos de bacilos, em particular aqueles localizados em lesões caseosas fechadas, onde a atividade metabólica dos bacilos pode ser lenta e episódica. A Z tem a particularidade de ser ativa em pH ácido, portanto, somente é eficaz contra os bacilos localizados no interior dos macrófagos. O E, em contraste aos outros anti-tuberculosos tem natureza bacteriostática, e não pode ser utilizado apenas com outra droga em tratamentos de curta duração, entretanto tem a capacidade de penetrar em meios extra e intracelulares e pode retardar a seleção de cepas mutantes resistentes (KONEMAN *et al.*, 2008).

No Brasil, o MS, adota os seguintes esquemas para tratamento de TB (MS, 2010).

1: Para crianças (<10 anos): na primeira fase - ou de ataque, são administradas quatro drogas em comprimidos compostos por dosagens fixas de R/150mg, H/75mg, Z /400mg e E/275mg, por um período de dois meses; segunda fase – ou fase de manutenção, as duas drogas são administradas em comprimidos com dosagens fixas de R/150mg e H/75mg, por período de mais quatro meses.

2: Para adultos e adolescentes (>10 anos): consiste na administração de drogas em doses fixas combinadas (DFC) de R/150mg, H/75mg, Z/400mg e E/275mg, por um período de dois meses, as unidades/doses dependem da faixa de peso. Após este período administra-se R/300 ou 200mg e H/150 ou 100mg em doses que variam com o peso, por período de mais quatro meses.

Estes esquemas estão indicados nos casos novos de todas as formas de TB (com exceção de meningoencefalite) e no retratamento: recidiva ou retorno após abandono com doença ativa, tanto para crianças como adultos e adolescentes, infectados ou não pelo HIV.

Para gestantes pode-se usar em qualquer período da gestação, em doses plenas, porém com acompanhamento especial e outras instruções específicas, como uso de máscaras no período de amamentação.

3: Para pacientes que necessitam de medicações diferentes dos citados acima, como por exemplo, com hepatopatias, nefropatias, efeitos adversos, entre outros.

A TB multidroga-resistente é uma forma de TB que não responde ao tratamento padrão por seis meses usando drogas de primeira linha (isto é H e R), o que implica na necessidade de tratamento com drogas de segunda linha que são mais tóxicas, menos eficazes e 100 vezes mais caras, com resultados mais prolongados, de 12 a 18 meses. O uso inadequado dessas, pode associar-se com resistências futuras, tornando o desafio do controle da TB ainda mais complexo e difícil (WHO/THE STOPTB, 2008).

4: Tratamento para Multirresistência

Está indicado para: resistência à R e H;

resistência à R e H e outro(s) fármacos de primeira linha;
e falência ao esquema básico

O esquema para multirresistência deve ser composto por pelo menos quatro drogas com atividades efetivas, preferencialmente não utilizadas anteriormente, como é demonstrado na quadro 1.

Quadro 1: Esquema de tratamento para TBMDR:
os esquemas são classificados em cinco grupos

Grupo 1	Medicamentos orais de primeira linha: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida.
Grupo 2	Medicamentos injetáveis: estreptomicina (primeira linha), ampicacina, canamicina e capreomicina (segunda linha)
Grupo 3	Fluorquinolonas: ofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina.
Grupo 4	Medicamentos orais de segunda linha: terizidona ou cicloserina, etionamida ou Ptoionamida e ácido paraminossalisílico (PAS)
Grupo 5	Medicamentos de eficácia menor ou não recomendados para uso de rotina: clofazimina, linezolida, amoxicilina/clavulanato, tiacetona, imipenem, isoniazida em altas doses e claritromicina.

Fonte: (MS/SVS/PNCT, 2010)

As recomendações adicionais dependem do histórico do paciente, dos efeitos adversos, do perfil do paciente como faixa de peso e outros. Os casos de TBMDR devem ser tratados e acompanhados em centros de referência (MS, 2010).

1.8 Diagnóstico Laboratorial

1.8.1 Microscopia-baciloscopia

Para interromper a cadeia de transmissão da TB é fundamental a descoberta precoce dos casos bacilíferos, que são a principal fonte de disseminação da doença e a descoberta precoce por meio da busca ativa é importante medida para interromper a cadeia de transmissão. (MS, 2010). É importante enfatizar que cerca de 90% dos casos de TB são da forma pulmonar e, destes, 60% são bacilíferos. O resultado é padronizado por quantificação em cruces, permitindo assim acompanhamento de controle de tratamento. O método de Ziehl-Neelsen (ZN) é o padronizado pelo MS. As colorações fluorescentes de auramina (AU), método do fluorocromo de Traunt são mais sensíveis mas tem seu uso limitado pois exige pessoal altamente qualificado e microscópio de imunofluorescência. (MS, 2008). Na figura 5 é demonstrada a coloração do ZN onde é visualizado o bacilo da TB.

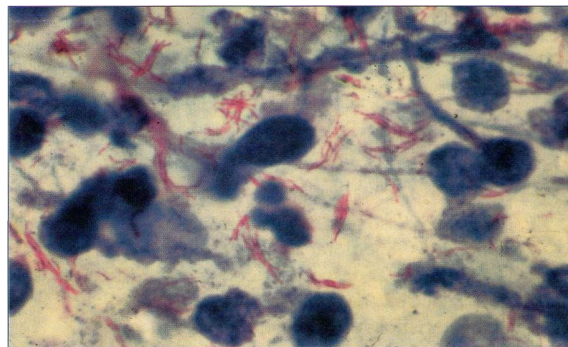


Figura 5 - Bacilos do *M. tuberculosis* corados pelo método de Ziehl-Neelsen

Fonte: (TORTORA *et al.*, 2000).

1.8.2 Cultura

É o exame laboratorial que permite a multiplicação e o isolamento de bacilos do *M. tuberculosis* a partir da sementeira da amostra clínica em meios de cultura específicos para micobactérias. No Brasil, o mais utilizado é o meio sólido Löwenstein-Jensen (LJ). É método sensível e específico para o diagnóstico das doenças causadas por micobactérias, principalmente para a TB pulmonar e extrapulmonar. O crescimento das micobactérias permite identificar a espécie e a realização de testes de sensibilidade, além da observação do tempo de crescimento, pigmentação das colônias e presença de contaminantes. (MS, 2008).

Em meio sólido as colônias de micobactérias cultivadas apresentam diferentes morfologias e pigmentação. A pigmentação é também, característica importante utilizada na classificação e pode variar de laranja a amarelo intenso. As suas características são: aspecto da colônia: lisa, rugosa; pigmentação da colônia: acromógena (creme), pigmentada (laranja, amarela, salmão).

A colônia de *M. tuberculosis* é acromógena, geralmente de cor creme, rugosa com aspecto de couve-flor (MS, 2008).

Na figura 6, podemos observar o aspecto macroscópico de colônias do *M. tuberculosis* em meio sólido LJ, após oito semanas de incubação.

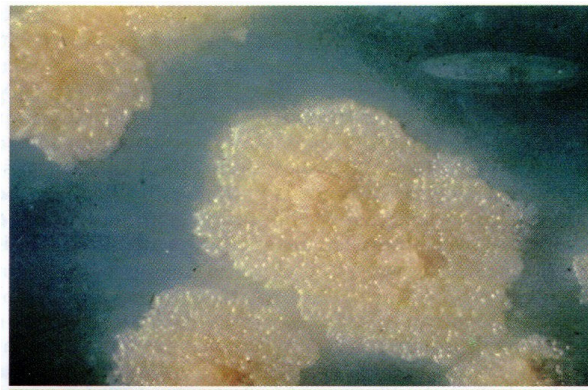


Figura 6 - Colônias de *M. tuberculosis* em ágar de LJ após oito semanas de incubação

Fonte: (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994).

1.8.3 Testes de Sensibilidade

Descrição

O Teste de Sensibilidade (TS) é o exame laboratorial utilizado para detectar a resistência e ou a sensibilidade das cepas do *M. tuberculosis* frente às drogas utilizadas no tratamento da TB. A resistência às drogas anti-tuberculosas é definida, como a diminuição da sensibilidade *in vitro* de uma cepa do *M. tuberculosis* comparado a um isolado que nunca entrou em contato com a droga (WHO, 2009).

De modo geral, é uma das principais tarefas executadas pelo laboratório de microbiologia e ou micobactérias. Além de orientar a escolha da terapia antimicrobiana mais adequada, o TS representa importante ferramenta no monitoramento da evolução da resistência bacteriana e

age como método auxiliar na implantação de medidas de controle que evitem a disseminação de bactérias MDR (OMS, 2008).

Métodos de Teste de Sensibilidade (TS)

A sensibilidade do *M. tuberculosis* às drogas pode ser avaliada pelo método: concentrações absolutas, razão de resistência e o das proporções que é considerado o padrão ouro, por ser altamente reprodutível, ter elevada correlação clínica e baixo custo. Entretanto é método trabalhoso e demorado, requerendo de quatro a seis semanas para obtenção dos resultados (CANETTI *et al.*, 1969; HEIFETS; CANGELOSI, 1999). Constituem métodos automatizados e validados o equipamento BACTEC TB-460 radiométrico (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) e o *Mycobacterial Growth Indicator Tube* (MGIT) (Becton Dickinson), que realizam o TS em menor tempo que os tradicionais, porém ainda são caros para os padrões do Brasil (KONEMAN *et al.*, 2008).

A fonte do inóculo para realização do TS pode ser pelo método direto (amostra biológica BAAR positiva) ou indireto, com o crescimento de colônias/bacilos em meios de cultura. O método direto é indicado quando a resistência é suspeita ou conhecida. Método indireto é considerado padrão para preparação do inóculo. Os resultados do método direto devem ser confirmados pelo indireto. O inóculo deve ser puro para ambos os métodos e com concentração padronizada de bacilos para evitar interpretações errôneas dos resultados. O método direto usa o número de bacilos observados na coloração sob avaliação e diluições feitas conforme a sua concentração e indireto, usa as colônias representativas de toda a população daquela cultura (KONEMAN *et al.*, 2008).

Há diversos meios padronizados para TS, sendo os mais comuns o Middlebrook 7H10 e o 7H11, meios mais caros suplementados com OADC (KONEMAN *et al.*, 2008). No Brasil o mais utilizado é o meio LJ (MS, 2008).

1.8.3.1 Método das Proporções em Meio LJ

Este método utiliza o meio sólido Löwenstein-Jensen (LJ), padronizado por Canetti em 1963 e simplificado pelo mesmo autor em 1969, que consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente à concentração de drogas que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não o das células resistentes, denominada “concentração crítica”. Para cada droga é definida proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente “proporção crítica”. Considera-se que uma droga de primeira linha não tem atividade no tratamento da TB quando ela é testada frente a um isolado de *M. tuberculosis* que contém mais de 1% de bacilos resistentes a uma concentração crítica da determinada droga, previamente estabelecida (CANETTI *et al.*, 1969).

1.8.3.2 MÉTODOS AUTOMATIZADOS

Há vários métodos que oferecem agilidade dos resultados de TS aos anti-tuberculosos com acurácia, como métodos moleculares de genotipagem e métodos automatizados como o BACTEC 460 equipado com “coifa TB” e frascos BACTEC 12B. A base deste teste em caldo consiste na detecção radiométrica de ^{14}C , liberado do meio líquido 7H12 contendo ácido 1- ^{14}C palmítico pelo metabolismo das bactérias. Este equipamento foi adaptado para realização de TS, tendo como princípio a aspiração do gás e conseqüente detecção quantitativa da radioatividade do aspirado. A radioatividade reflete o grau de crescimento dos bacilos viáveis no frasco e sendo comparado com um valor basal pré-determinado, estabelecendo assim o índice de crescimento. O nível de concordância entre os métodos padrões e o radiométrico ultrapassa 90%. A utilização de radioatividade torna seu uso limitado e caro. Outros instrumentos como o MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) e o ESP II Métodos System (Trek Diagnostic), são também utilizados com níveis de concordância altos (KONEMAN *et al.*, 2008), porém são tecnologias caras que necessitam de insumos importados, equipamentos sofisticados, complexa estrutura laboratorial e de uma equipe técnica altamente qualificada, fatores limitantes para sua utilização. (PALOMINO *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2004; SANCHOTENE *et al.*, 2008; PALMERO, 2008).

1.8.3.3 Métodos Colorimétricos

Recentes publicações descreveram metodologias colorimétricas rápidas, de execução simples e de baixo custo para TS frente às drogas anti-tuberculosas de primeira e segunda linhas, utilizando indicadores de oxi-redução como Alamar Blue (YAJKO, *et al.*, 1995), MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MSHANA *et al.*, 1998) e REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate) (PALOMINO *et al.*, 2002) para estudo do MIC (Concentração Inibitória Mínima) e o método qualitativo NRA (Nitrate Reductase Assay) (ÄNGEBY *et al.*, 2002).

1.8.3.3.1 Método NRA

O teste do NRA é baseado na capacidade do *M. tuberculosis* em reduzir o nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) como indicador de viabilidade celular, através da atividade da enzima nitrato-redutase. O nitrito produzido na reação é detectado após adição de solução de ácido clorídrico, sulfanilamida e N-1 naftiletlenodiamino desenvolvendo coloração rosa imediata. Esta reação foi denominada reação de Griess, após J.P Griess tê-la descrito em 1879. O teste do nitrato é realizado de rotina como teste bioquímico para identificar o *M. tuberculosis*, o que torna o método do NRA altamente específico (ÄNGEBY *et al.*, 2002; VIRTANEN, 1960).

A figura 7 demonstra as etapas da reação de redução do nitrato a nitrito.

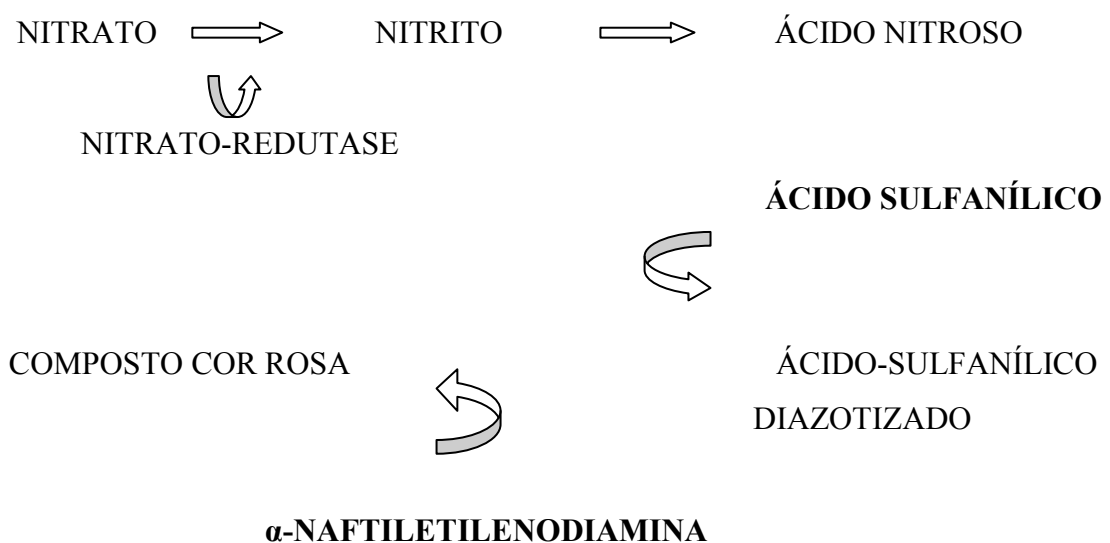


Figura 7 - Reação de redução do Nitrato a Nitrito - Reação de Griess
Fonte: (EUCCO-Net, 2009).

Em 2002, Ängeby avaliou o método do NRA para TS frente aos anti-tuberculosos de primeira linha, obtendo resultados após sete dias de incubação, com concordância de 100% para R e global de 94% para as quatro drogas testadas, H, R, S e E com o sistema BACTEC 460TB, utilizado como referência. Este método foi primeiramente utilizado por Emil Kalfin (*National Institute for Lung Diseases*, Sofia, Bulgária) e Andreas Engibarov (*National Center of Infectious and Parasitic Diseases*, Sofia, Bulgária) desde 1989 em laboratórios de micobacteriologia da Bulgária sob a denominação “teste da atividade da nitrato-redutase”, PANAIOTOV, KANTARDJIEV (2002), entretanto Ängeby, 2002 é referenciado pela maioria dos pesquisadores como responsável por sua importância após a realização de algumas adaptações como concentração crítica das drogas, tamanho do inóculo e número de tubos controle utilizados no teste.

O teste do NRA utiliza o meio de LJ incorporado com KNO_3 e com concentrações críticas de drogas iguais ao MP e tubos controle com meio sem drogas, para avaliar o tempo de leitura através do crescimento bacteriano. Vários estudos realizados em diversas partes do mundo demonstraram a utilização do NRA para detectar a viabilidade do *M. tuberculosis* quando em contato com drogas anti-tuberculosas, mostrando resultados com boa acurácia, alta sensibilidade e especificidade, especialmente para H e R quando comparados com métodos padrão-ouro como MP, MIC pelo REMA e pelo MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*) e BACTEC (ÄNGEBY *et al.*, 2002; LEMUS *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2005; SOLÍS *et al.*, 2005; BARRERA; MONTORO, 2007; AFFOLABI *et al.*, 2008; SANCHOTENE *et al.*, 2008).

A avaliação do NRA diretamente de amostras clínicas com baciloscopias positivas foi descrita por alguns autores (AFFOLABI *et al.*, 2007; MUSA *et al.*, 2005). Os resultados destes trabalhos apresentaram forte concordância para R e H. A grande vantagem do NRA direto da amostra é a diminuição do tempo entre a obtenção da amostra clínica e o resultado do TS entre 10 e 18 dias, porém há maior necessidade de padronização do inóculo, pois pode-se utilizar somente amostras com baciloscopias acima de 2+ ou mais, além das possibilidades de infecções por micobactérias que não do complexo *M. tuberculosis*, além de contaminações por bactérias comuns (PALMERO, 2008).

A possível limitação do uso de NRA direto da amostra é que algumas micobactérias atípicas (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens* e *M. terrae*), são capazes de reduzir o nitrato a nitrito e por outro lado nem todas as espécies pertencentes ao complexo MTB (CMTB), como *M. bovis*, é capaz de reduzir nitrato a nitrito (KENT; KUBICA, 1985). Esta limitação para cepas

de *M. tuberculosis* que não reduzem o nitrato a nitrito é muito rara, já que <1% das espécies não possuem a enzima nitrato redutase (KENT; KUBICA, 1985).

Na reação de redução do nitrato a nitrito, outros compostos podem ser reduzidos como amoníaco, nitrogênio molecular, óxido nítrico, óxido nitroso ou hidroxilamina. Neste caso não haverá mudança de cor no teste do NRA. Para confirmar a reação, adiciona-se pequena quantidade de zinco (Zn) em pó que reduzirá imediatamente o nitrato a nitrito, alterando para cor rosa, caso tenha nitrato no meio, caracterizando esta reação negativa para o *M. tuberculosis*. O processo de redução ocorreu se após adição do Zn não houve desenvolvimento de cor, não se obteve nitrito (ÄNGEBY *et al.*, 2002; VIRTANEN, 1960).

1.8.3.3.2 MÉTODOS: REMA e MTT

Princípios dos métodos colorimétricos - indicadores de oxi-redução: os sais de resazurina mudam de cor azul (não fluorescente) quando está no seu estado oxidado a rosa intenso (fluorescente) frente a ambiente redutor como o gerado durante o metabolismo celular, pela ação da enzima desidrogenase. (LIU, 1981; PALOMINO *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2003; PALOMINO *et al.*, 2006). O azul de tetrazólio funciona como substrato cromogênico de enzimas desidrogenases mitocondriais, agindo como indicador de oxi-redução quando é reduzido pelo ganho de hidrogênio, por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular. No teste do MTT, há formação de precipitado chamado formazana, que é extraído de dentro das células através de um solvente (MOSMANN, 1983). A produção de formazana tem sido empregada como medida indireta da viabilidade celular do *M. tuberculosis* após exposição a drogas anti-tuberculosas (ABATE *et al.*, 1998; MSHANA *et al.*, 1998). A mudança de cor de ambos os corantes pode ser lida visualmente ou por espectrofotometria e a concentração inibitória mínima (MIC) é então determinada.

MIC por definição é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microorganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou meio líquido (NCCLS, 2003).

2 JUSTIFICATIVAS

A introdução de NRA, REMA e MTT como testes de sensibilidade aos anti-tuberculosos frente às cepas do *M. tuberculosis* no laboratório de micobactérias do HC/UFMG, hospital de alta complexidade, é urgente e necessária e poderá ser rápida e acurada.

Essas ferramentas diagnósticas contribuirão para melhor manejo no tratamento do paciente, permitirá conhecer o perfil de resistência na comunidade, além de possibilitar a rápida identificação de casos de TBMDR ou de outros perfis de resistência, possibilitando a reformulação de esquemas terapêuticos para obtenção de sucesso no tratamento, o que constitui uma das contribuições mais importantes nos programas de controle da TB, principalmente em instituições onde há atendimento de pacientes co-infectados com o HIV e outras co-morbidades imunossupressoras.

As metodologias do NRA, REMA e MTT foram utilizadas neste estudo para serem padronizadas, avaliadas e posteriormente validadas em rotina no HC/UFMG.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil fenotípico de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) frente aos antituberculosos.

3.2 Objetivos Específicos

1) Investigar o Teste de Sensibilidade (fenótipo) de cepas de *M. tuberculosis* frente aos anti-tuberculosos:

- a) Pelo método de proporção em Lowenstein-Jensen (LJ).
- b) Pelo teste do Nitrato redutase-Nitratase (*Nitrate Reductase Assay*-NRA).

2) Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) de cepas do *M. tuberculosis* frente os anti-tuberculosos, utilizando:

- a) O teste colorimétrico 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT).
- b) O teste colorimétrico *resazurin microtiter assay* (REMA).

3) Descrever o tempo de realização dos testes de sensibilidade de cepas do *M. tuberculosis*.

4) Comparar os resultados dos novos testes com a metodologia padrão de referência: Método de Proporção em LJ

5) Conhecer o perfil de resistência primária e secundária dos pacientes portadores de cepas do *M. tuberculosis* isolados de pacientes de um Hospital Geral em Belo Horizonte, Brasil.

Seguindo as orientações do Programa de Pós Graduação de Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto um artigo deve ser escrito para a qualificação de mestrado. Esse artigo refere-se ao método NRA.

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Brazilian Journal of Microbiology*, intitulado:

“AVALIAÇÃO DE TESTE DE SENSIBILIDADE UTILIZANDO O MÉTODO “NITRATE REDUCTASE ASSAY” (NRA) EM CEPAS DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, ISOLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM HOSPITAL GERAL, BELO HORIZONTE, BRASIL”.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG.

4 ARTIGO

AVALIAÇÃO DE TESTE DE SENSIBILIDADE UTILIZANDO O MÉTODO “NITRATE REDUCTASE ASSAY” EM CEPAS DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ISOLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM HOSPITAL GERAL, BELO HORIZONTE, BRASIL

Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur¹, Wânia da Silva Carvalho², Silvana Spíndola de Miranda^{1,3*}

Laboratório de Microbiologia/Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Minas Gerais¹

Departamento de Farmácia Social/Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal de Minas Gerais²

Departamento de Clínica Médica/Faculdade de Medicina/Grupo de Pesquisa em Micobacterioses/CNPq/Laboratório de Micobactérias do Hospital das Clínicas Universidade Federal de Minas Gerais^{1,3*}

RESUMO

O surgimento de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* multidrogas-resistentes (TBMDR) em pacientes portadores ou não do HIV leva a uma maior letalidade. Além do que é comum que esses pacientes se encontrem hospitalizados. Testes de sensibilidade mais sensíveis e rápidos devem ser utilizados para evitar retardo do tratamento e disseminação destas cepas. O objetivo deste estudo foi comparar o teste de sensibilidade utilizando a método de NRA (*nitrate reductase assay*) de cepas do *M. tuberculosis* isoladas de pacientes de um hospital geral e cepas de referência, frente às drogas, rifampicina (R), isoniazida (H), estreptomicina (S) e etambutol (E) com o Método das Proporções. Em um total de 57 cepas a sensibilidade para R, H, S e E foram 100%, 100%, 88,9% e 98%, respectivamente. A especificidade para R, H, S e E foram de 100%, 100%, 66,7 e 100%, respectivamente. A acurácia para R e H foi de 100%, para S de 96,5% e para E de 98,2% e kappa de 0,87 para S e 0,79 para E. Dois pacientes eram portadores de cepas TBMDR, sendo um paciente soropositivo para o HIV, que foi a óbito. A média do tempo de leitura dos resultados foi de dez dias. O método NRA mostrou uma excelente concordância e acurácia, o que constitui uma importante ferramenta laboratorial pela sua rapidez e pode servir como alternativa de implantação em países com escassez de recursos. Porém, avaliações de custo-efetividade devem ser feitas no país.

Introdução

A tuberculose (TB) permanece como as maiores causas de mortalidade e morbidade por infecção em humanos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), com 9,4 milhões de novos casos e 1,3 milhões de mortes por TB no mundo respectivamente. A incidência mundial é de 140 casos por 100 mil habitantes (26).

O surgimento do *M.tuberculosis* multi-droga resistente (TBMDR), definidas como resistentes a isoniazida (H) e rifampicina (R) e a forma extensivamente resistente (TBXDR), resistente a H e R, a uma das três drogas injetáveis: amicacina, canamicina, capreomicina e uma fluorquinolona, tornaram este cenário preocupante (26). Em pacientes co-infectados com o HIV e portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida, a doença é mais grave, o tratamento é menos eficaz e a mortalidade maior. Dados sobre esta associação foram descritas em estudo na África do Sul, em que 98% dos pacientes co-infectados com HIV/TBXDR foram a óbito (10).

De acordo com a OMS, em 2008 houve aproximadamente 440.000 casos de TBMDR, representando 3,6% de todos os casos de incidência de TB no mundo (26). Em alguns países este índice atinge cerca de 30%, sendo que o número de mortes por esta forma de TB foi de 150.000 pacientes. Em nível mundial o número de pacientes com TBMDR em pacientes portadores do vírus HIV é de 500 mil casos e taxa de 7,8% (26).

No Brasil a média do número de casos novos de TBMDR entre 2002 e 2009 foi de 350 e 394, respectivamente (4).

No Brasil a taxa de letalidade em 2008 para pacientes TB/HIV foi de 21% enquanto para TB foi de 4%. Na última década várias propostas de técnicas rápidas para testes de sensibilidade (TS) aos antituberculosos de primeira linha foram descritas, como métodos genotípicos, métodos automatizados como BACTEC 460 (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD), o BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD Diagnostic) e o ESP II (Trek Diagnostic Systems, Westlake, OH). Essas metodologias são caras, os insumos são importados, tornando sua implantação dificultada, pois há necessidade de mais recursos, equipamentos e de infra-estrutura laboratorial mais complexa (13).

Métodos fenotípicos rápidos, como os colorimétricos, de fácil execução e baixo custo têm apresentado bons desempenhos para realização de testes de sensibilidade frente às drogas de primeira e segunda linha, como o método NRA (*Nitrate Reductase Assay*) (1,23,28,34).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade, especificidade, concordância e reprodutibilidade do método NRA em comparação ao método de proporção (MP) em cepas de *M. tuberculosis* frente às drogas R, H, S e E.

Pacientes, Materiais e Métodos

Pacientes

Um total de 57 cepas do *M. tuberculosis* foram isoladas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG), hospital geral, de alta complexidade. As cepas foram incluídas consecutivamente de janeiro de 2009 a junho de 2010 que chegaram ao laboratório de micobactérias/HC/UFMG. Essas cepas representaram 73% das culturas positivas recuperadas em um ano neste hospital.

Foram incluídas no estudo somente cepas *M. tuberculosis* que tinham identificação e teste de sensibilidade realizadas pelo Centro de Referência do Estado de Minas Gerais.

Cepas de referência do *M. tuberculosis*

Foram utilizadas 14 cepas de referência do *M. tuberculosis* cedidas pelo Centro de Referência do Estado de MG, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), que fazem parte de um painel internacional de proficiência de testes de sensibilidade. Os perfis de sensibilidade dessas cepas foram: uma XDR, quatro MDR, três resistentes a H e S, três resistentes a R e S, uma resistente somente a R, uma resistente somente a H e uma resistente somente a S. A cepa de referência H37Rv (ATCC 27294) foi utilizada como controle sensível.

O Método das Proporções (MP) foi realizado segundo Canetti *et al.*, 1969 na FUNED (06). As drogas utilizadas para o teste de sensibilidade pelo método NRA foram Rifampicina Sigma®, Isoniazida (Isonicotinic Acid Hydrazide) Sigma®, Ethambutol Dihydrochloride Sigma® Chemical CO, Sulfato de Estreptomina Sigma®. Os testes foram repetidos duas vezes para avaliar a reprodutibilidade.

Os cálculos estatísticos foram realizados pelo programa *Cálculos Estatísticos Básicos* para Testes Diagnósticos (03).

NRA:

O método e o preparo das soluções das drogas foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Ängeby, 2002 e pelo Protocolo do Instituto de Micobacteriologia - NRA, Bélgica (1,18).

Para H, E e S foram preparadas soluções estoque de 10.000 µg/mL em H₂O e duas diluições subsequentes foram preparadas para atingir a concentração crítica da droga no meio. Para R foi utilizada somente solução estoque de 4.000 µg/mL diluída em etilenoglicol e a partir desta utilizou-se volume adequado para atingir concentração crítica no meio. As concentrações críticas no meio LJ foram: 0,2 µg/mL para H, 40,0 µg/mL para R, 4,0 µg/mL para S e 2,0 µg/mL para E.

O meio de cultura foi preparado conforme especificações do fabricante DIFCOTM/BD Löwenstein Medium Base e incorporado com solução de KNO₃ (1,0 mg/mL) e com as soluções de uso das drogas, uma quantidade do meio foi preparada somente com solução de KNO₃. O inóculo bacteriano foi ajustado na escala McFarland nº 1 e outra suspensão preparada a uma diluição 1:10 em solução tampão fosfato (PBS).

O teste foi realizado de acordo com os seguintes procedimentos: para cada meio de LJ com droga foi adicionado 200 µl da suspensão bacteriana nº 1 da escala McFarland e 200 µl da suspensão diluída 1:10 foi adicionada em três tubos de meio LJ sem droga, utilizados como controle de crescimento. Após sete dias de incubação a 37°C, adicionou-se 500µl da solução reveladora: 50% (v/v) de ácido clorídrico concentrado (HCl) (1x), 0,2% (p/v) de sulfanilamida (2x) e 0,1% (p/v) de dicloridrato de N-1 naftiletilenodiamino (1x), em um dos tubos controle (sem drogas). Adicionou-se a solução reveladora nos tubos correspondentes com drogas, quando ocorreu qualquer mudança de cor, de incolor para rosa. O tubo controle era descartado se não ocorresse mudança de cor, e os outros re-incubados. O procedimento foi repetido após 10 dias com o segundo tubo controle, e se necessário, após 14 dias com o terceiro tubo controle.

O isolado foi considerado resistente quando a cor do tubo com droga foi mais intenso em comparação com a do tubo controle, que tinha a bactéria diluída a 1:10. A cepa foi

considerada sensível quando não houve mudança de cor nos tubos com drogas ou mais clara que a do tubo controle. Os resultados foram comparados com o MP, de maneira cega. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG.

Resultados

Foram excluídas 16 cepas: três foram identificadas como Micobactérias não tuberculosas e 13 por não haver crescimento suficiente para a realização do Teste de Sensibilidade pelo MP.

A mediana de idade dos pacientes foi de 45 anos (1-76 anos), 66% e 34% eram masculino e feminino respectivamente. Dois pacientes eram portadores de cepas do TBMDR. Em 34/43 (79%) dos pacientes que realizaram sorologia para HIV, 11/34 (32%) eram positivos, sendo um portador de TBMDR. Este paciente foi a óbito.

Houve 100% de concordância entre o MP e o NRA em relação às cepas do *M. tuberculosis* do painel internacional de proficiência, provenientes da FUNED.

Na tabela 1 encontram-se os resultados das 57 cepas do *M. tuberculosis* (cepas de proficiência (14) e das isoladas dos pacientes (43). Houve 100% de concordância com o MP para R e H. As discordâncias para S foram observadas em duas cepas (uma resistente pelo MP e sensível pelo NRA e uma sensível pelo MP e resistente pelo NRA) e outra foi discordante para E (resistente pelo MP e sensível pelo NRA). Os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) para R e H foram de 100%, os VPP e VPN de S e E foram de 88,9 e 100% e 98 e 98,2% respectivamente e kappa de 0,87 (muito boa concordância) para S e 0,79 (boa concordância) para E.

Todos os pacientes portadores de cepas sensíveis pelo MP e concordantes com o teste NRA tiveram alta por cura, inclusive os três pacientes em que os resultados dos testes foram discordantes. Estes pacientes não tinham passado de TB ou histórico de contato com portadores de cepas resistentes, e sem história de recidiva até o final do estudo.

Todos os testes do NRA foram realizados em duplicata, com resultados iguais, e avaliados por um único observador (repetibilidade). O tempo médio para a obtenção dos resultados foi de 10 dias.

Discussão

A necessidade de introduzir testes rápidos para detecção de resistência e para vigilância epidemiológica reflete a carência destes exames no contexto de um hospital escola e de alta complexidade, onde são realizados procedimentos complexos, como transplante de órgãos sólidos e de medula óssea, atendimento de pacientes com hepatopatias, nefropatias, *diabetes mellitus*, outras co-morbidades e imunocomprometidos, principalmente portadores de HIV que favorecem o aparecimento de TBMDR.

A emergência de cepas MDR em hospitais no início da década de 90 ameaçou o controle da TB, constituindo-se em importante problema de saúde pública em todo mundo (9).

O ambiente hospitalar tem mostrado ser favorável a disseminação de cepas MDR do *M. tuberculosis*, como ocorreu recentemente em hospital na África do Sul (10). As estratégias de controle de infecções nosocomiais incluem exaustão, filtros HEPA (*High Efficiency Particulate Air*), luz UV, pressão negativa e equipamentos de proteção individual para os profissionais de saúde como uso de máscaras N-95, controle de saúde dos profissionais – inquérito tuberculínico, uso de máscaras cirúrgicas para os pacientes, agilidade na realização da baciloscopia para evitar a disseminação da TB e de possíveis cepas do *M. tuberculosis* MDR (12).

O uso prévio de drogas anti-TB é o maior indicador clínico de desenvolvimento de multirresistência, que pode decorrer de uso inadequado ou abandono do tratamento, representando fenômeno biológico iatrogênico. A estratégia *DOTS* (*Directly Observed Treatment Short course*) ou Estratégia do Tratamento Diretamente Observado da TB constitui-se em intervenção em todo mundo, adotada pelo Brasil e que tem como objetivo o aumento da probabilidade de cura dos doentes em função da garantia do tratamento assistido, proporcionando adesão dos pacientes ao tratamento, o que contribui para a interrupção da doença, além de prevenir o surgimento e disseminação de TBMDR, além de outras medidas fundamentais para o controle da TB (4,7).

Este trabalho é o primeiro a avaliar em Minas Gerais o desempenho do teste de NRA em cepas de *M. tuberculosis* frente às drogas R, H, S e E.

A maioria dos pacientes era do sexo masculino e em idade produtiva. Destes, 32% eram soropositivos para o HIV, demonstrando a alta prevalência da co-morbidade TB/HIV no Complexo Hospitalar/UFGM, corroborando com outros trabalhos (5).

A taxa de TBMDR total foi de 4,7% (2/43) e de pacientes HIV positivos associado à TBMDR foi de 2,3% (1/43). Esse dado é semelhante a outro estudo realizado em hospital terciário do Brasil, em que não houve associação de HIV/TBMDR como fator de risco, assim como em revisão sistemática realizada em 32 estudos, onde não se observou uma associação entre a prevalência de TBMDR e infecção pelo HIV (20, 33). Em estudo realizado em hospitais de referência para pacientes soropositivos para HIV, foi mostrada esta associação (8).

A análise da sensibilidade, especificidade, concordância e acurácia do método NRA revelou-se com excelente desempenho para a sua utilização em rotina de laboratório de micobactérias para R e H. (Tabela 1), o que está de acordo com as metas da OMS que espera que o método tenha uma eficiência de 99% para a R, 97% para a H, e 92% para a S e o E (14). Porém, para S e E a concordância foi inferior a preconizada, porém semelhante a outros estudos (31).

Todas as cepas isoladas de pacientes sem história de TB anterior tiveram seus testes de sensibilidade sensíveis às drogas testadas, exceto um, que nunca tinha tratado e era portador de TBMDR (resistência primária), proveniente da cidade do Rio de Janeiro, local com a maior taxa de TBMDR no Brasil (4). O paciente soropositivo para o HIV e portador de TBMDR, tinha história de vários abandonos, o que ocasionou a resistência e o óbito. O paciente soronegativo para o HIV iniciou esquema especial (esquema para TBMDR) preconizado pelo MS do Brasil teve alta por cura e continua a ser acompanhado no Centro de Referência do Estado de Minas Gerais. Estudos realizados no Brasil têm descrito o grande problema da emergência de cepas resistentes aos antituberculosos e a alta mortalidade devido a não adesão ao tratamento em pacientes HIV positivos (4,11,24).

Em duas cepas do *M. tuberculosis* provenientes de dois pacientes em que os resultados foram discordantes para S e E, uma cepa resistente pelo MP e sensível pelo método NRA para a S, e outra resistente pelo MP e sensível pelo NRA para E, não foi possível avaliar o resultado *in vitro* com a resposta clínica, pois estes pacientes fizeram uso de R, H, e Z por dois meses, e mais quatro meses com R e H, não sendo prescrito S e E. Estes pacientes fizeram uso regular da medicação, não tinham história de contato com pacientes suspeitos de serem portadores do *M. tuberculosis* resistente ou passado de TB, tiveram alta por cura e até o momento não

apresentam sintomatologia de recidiva da doença. Apesar das discordâncias citadas acima, estas não comprometeram a avaliação dos resultados do método NRA obtidos neste estudo.

Estudo realizado no Brasil onde comparou o método NRA e o método REMA este como padrão, obteve muito boa concordância para H e R, porém para S e E, os valores de sensibilidade e especificidade foram mais baixos, 87,5 e 75% para E e 76,9 e 80% para S respectivamente (31). Na última década outros autores também obtiveram alta concordância entre NRA para R e H utilizando como método padrão (MP, REMA, métodos automatizados, entre outros) (1, 15, 16, 32). O método NRA para H e R, foi avaliado por dois estudos multicêntricos e os resultados de sensibilidade ficaram entre 88 e 100%, com média de 97 e a especificidade de 100% para todos os 15 estudos analisados entre 2002 e 2007, os valores de sensibilidade e especificidade para H, R e E tiveram forte concordância, porém para S os valores foram baixos com concordância geral de 85,3% (17,19).

Neste estudo os resultados encontrados foram semelhantes aos relatados por outros trabalhos (Tabela 1), o que demonstra excelente desempenho do NRA para teste de sensibilidade. Entretanto para fins de decisão quanto ao regime a ser utilizado em pacientes com TB, deve-se considerar o histórico terapêutico desses pacientes, junto com o resultado do teste de sensibilidade (30).

Há relatos de resultados com sensibilidade e especificidade abaixo do aceitável para S e E, porém neste estudo a discordância encontrada foi relativa à sensibilidade da S (tabela 1). Tais problemas podem ser atribuídos ao efeito bacteriostático do E e na estreita faixa que existe entre os pontos de corte dos MIC de cepas sensíveis e resistentes, perda de atividade destas drogas quando incorporadas em meio de cultivo, e aos diferentes tempos de incubação quando comparados por métodos diferentes (2, 21).

Mitchison critica a confiança dos valores dos TS e sugere a definição de MICs individuais para cada droga como prioridade, através de validação laboratorial. Em um artigo de revisão sobre métodos colorimétricos para TS foi mostrada baixa acurácia para detecção de S pelo método NRA (22,29).

O MP é o método de sensibilidade padrão-ouro, porém requer mais de dois meses para obtenção dos resultados, o que representa fator limitante para a prática, que requer rapidez diagnóstica e abordagem terapêutica. A busca de alternativas constituem, portanto objeto fundamental para impedir evolução inadequada da TB e disseminação do *M. tuberculosis*.

Como descrito acima, os métodos genotípicos e automatizados como BACTEC TB-460, MGIT (*Mycobacterium Growth Indicator Tubes*) são caros o que torna difícil sua aplicabilidade em países de poucos recursos. (1,32).

São propostos para suprir este problema, métodos colorimétricos rápidos como o Alamar Blue, o MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide e o REMA Resazurin Microtiter Assay Plate para determinação do MIC (Concentração Inibitória Mínima) também são propostos (1,23,28,34). Porém, o método NRA como teste de sensibilidade poderá substituir o MP pela sua alta concordância.

Este estudo demonstrou o alto potencial do método NRA como utilização de teste de sensibilidade, principalmente frente às drogas R e H, marcadoras de resistência e as mais importantes para o tratamento da TB. Soma-se a estas vantagens a possibilidade de obtenção de resultado em até 14 dias; neste estudo a média do tempo foi de 10 dias, comparável aos métodos automatizados e muito mais rápido que o MP, o único disponível atualmente para o Laboratório de micobactérias do HC/UFGM. Acresce a esses benefícios o seu baixo custo. (1,26).

Testes de NRA realizados direto da amostra já foram estudados, com bons resultados, evidenciando 100% para sensibilidade e especificidade para R e 93% e 100% respectivamente para H. Há necessidade de mais avaliações para sua utilização como teste diagnóstico em laboratórios clínicos (25).

A OMS faz algumas considerações sobre a utilização do método NRA em laboratórios de micobactéria. Como: os reagentes não são patenteados, o que os tornam mais baratos e acessíveis; não necessita de equipamentos complexos ou de equipe técnica altamente capacitada; e sua realização é compatível com os procedimentos técnicos de biossegurança nível II; a leitura dos resultados é muito fácil e visual, pois o aparecimento da cor é imediato e permite a realização de maior número de testes ao mesmo tempo, sendo altamente promissor e aplicável (27).

Algumas limitações foram encontradas no período do estudo: não foi possível recuperar todas as cepas do *M. tuberculosis* e não houve um número representativo de cepas isoladas de pacientes que fossem resistentes às drogas testadas.

Conclusão

O método NRA constitui importante ferramenta laboratorial pela sua rapidez e eficácia, e representa alternativa para implantação em laboratórios de países com escassez de recursos. Avaliações de custo efetividade e do impacto clínico do seu uso devem ser feitos no Brasil.

Acknowledgements:

A Pós-Graduação da Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Referências

- 1 Ängeby, K.A.; Klintz, L.; Hoffner, S.E (2002). Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *J Clin Microbiol* 40:553-555.
- 2 Böttger, E.C (2007). Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *Eur J Pediatric* 168:141-148.
- 3 Braile, D.M.; Godoy, M.F (1999). Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos.
- 4 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose (2010). Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil.
- 5 Brito, R.C.; Gounder, C.; Lima, D.B.; Siqueira, H.; Cavalcanti, H.R.; Pereira, M.M.; Kritski, A.L (2004). Resistência aos medicamentos antituberculose de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. *J Bras Pneumol* 30(4):425-432.
- 6 Canetti, G.; Fox, W.; Khomenko, A.; Mahler, H.T.; Menon N.K.; Mitchison, D.A.; Rist, N.; Smelev, N.A (1969). Advances in Techniques of Testing Mycobacterial Drug Sensitivity and the use of Sensivity Tests in Tuberculosis Control Programmes. *Bull World Health Organization* 41: 21-43.
- 7 Espinal, M.A (2003). The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis (Edinb)* 83 (1-3):44-51.
- 8 Fandinho, F.C.O.; Kritski, A.L.; Hofer, C.; Conde Jr, H.; Ferreira, R.M.C.; Silva, M.G.; Fonseca, L.S (1999). Drug Resistance Patterns among Hospitalized Tuberculous Patients in Rio de Janeiro, Brazil, 1993-1994 *94(4):543-547*.

- 9 Frieden, T.R.; Sterling, T.; Pablos-Mendez, A.; Kilburn J.O.; Cauthen, G.M.; Dooley, S.W (1993). The Emergence of Drug-Resistant Tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 328(2):521-526.
- 10 Gandhi, N.R (2006). Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 4:368(9547):1554-1556.
- 11 Oliveira H.B.; Marín-León L.; Cardoso J.C (2004). Differences in mortality profile of tuberculosis patients related to tuberculosis-AIDS co-morbidity. *Rev Saúde Pública* 38(4):503-510.
- 12 Oliveira, H.M.M.G.; Brito, R.C.; Kritski, A.L.; Ruffino-Neto, A (2009). Perfil Epidemiológico de pacientes portadores de TB internados em um hospital de referência na cidade do Rio de Janeiro 35(8):780-787.
- 13 Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Scheckenberger, P.C.; Winn J.R. W.C. (2008) – Diagnóstico Microbiológico. 6^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (19):1057-1118.
- 14 Lazlo, A.; Rahman, M.; Espinal M.; Raviglione, M (2002).WHO/IUATLD Network od Supranacional Reference Laboratories. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranacional Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. *Int J Tuberc Lung Dis.* 6(9):748-756.
- 15 Lemus, D.; Montoro, E.; Echemendía, M.; Yzquierdo, S.L.; Martin, A.; Portaels, F.; Palomino, J.C (2005). New methods for detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biocnologia Aplicada* 22(4): 309-311.
- 16 Lemus, D.; Montoro, E.; Echemendía M.; Martin, A.; Portaels, F.; Palomino, J.C (2006). Nitrate reductase assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: simple and inexpensive method for low-resource laboratories. *J Med Microbiol* 55:861-863.

- 17 .Martin, A.; Montoro, E.; Lemus, D.; Simboli, N.; Morcillo, N.; Velasco, M.; Chauca, J.; Barrera, L.; Ritacco, V.; Portaels, F.; Palomino, J.C (2005). Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J of Microbiological Methods* 63(2): 145-150.
- 18 Martin, A.; Palomino. P.C (2009). “Procedure Manual NRA-Drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* do Institute of Tropical Medicine, Mycobacteriology Unit, Antwerp, Belgium” Version 02.
- 19 Martin, A.; Panaiotov, S.; Portaels, F.; Hoffner, S.; Palomino, J.C and Ängeby, K.A (2008). The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J of Antimicrob Chemother* (63): 56-64.
- 20 Matos, E.D.; Lemos, A.C.M.; Bittencourt, C.; Mesquita, C.L (2007). Anti-Tuberculosis Drug Resistance in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Patients in a Tertiary Hospital in Bahia. *Braz J infect Dis* 11(3):331-338.
- 21 Mengatto, L.; Chiani, Y.; Imaz, M.S (2006). Evaluation of Rapid alternative methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101 (5):535-542.
- 22 Mitchison, D.A (2005). Drug resistance in tuberculosis. *Eur Respir J* 25(2):376-379.
- 23 Mshana, R.N.; Tadesse, G.; Abate, G.; Miörner, H (1998). Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for rapid detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 36(5):1214-1219.
- 24 Muniz J.N.; Ruffino-Netto A.; Villa T.C.; Yamamura M.; Arcencio R.; Cardozo-Gonzales R.I (2006). Epidemiological aspects of human immunodeficiency virus/tuberculosis co-infection in Ribeirão Preto, Brazil from 1998 to 2003. *J Bras Pneumol* 32(6):529-534.

- 25 Musa, H.R.; Ambroggi, M.; Souto, A.; Ängeby, K.A (2005). Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy positive sputum samples. *J Clin Microbiol* 43:3159-3161.
- 26 Organização Mundial da Saúde (2010). Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010 Global Report on Surveillance and Response (document WHO/HTM/TB/2010.3).
- 27 Organização Mundial da Saúde (2010). Non-commercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis.
- 28 Palomino, J.C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F (2002). Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 46(8): 2720-2722.
- 29 Palomino, J.C.; Martin, A.; Portaels, F (2007). Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods. *Clin Microbiol Infect* 13: 754-762.
- 30 Picon, P.D.; Rizzon, C.F.C.; Freitas, T.M.; Azevedo, S.N.B.; Gutierrez, R.S (1993). Resultados do tratamento. In: Picon, P.D.; Rizzon, C.F.C.; Ott, W.P, editores. Tuberculose: Epidemiologia, Diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda :504-523.
- 31 Sanchotene, K.O.; Groll, vonA.; Ramos, D.; Scholante, A.B.; Hosscha, G.; Valenca, M.; Scaini, C.J.; Silva, P.E.A (2008). Comparative evaluation of the nitrate reductase assay and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, against first line anti- tuberculosis drugs. *Brazilian J of Microbiol* 39:16-20.
- 32 Solis, L.A.; Shin, S.S.; Han, L.L.; Llanos, F.; Stowell M.; Sloutsky, A (2005). Validation of a rapid method for detection of *M tuberculosis* resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis* 9(7): 760-764.

33 Suchindram, S.; Brouwer, E.S.; Van Rie, A (2009). Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review. *PLoS One* 4(5):e5561.

34 Yajko, D.M.; Madej, J.J.; Lancaster, M.V.; Sanders, C.A.; Cwthon, V.L.; Gee, B.; Babst, A.; Hadley, W.K (1995). Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 33(9):2324-2327.

Tabela 1 - Resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia pelo método NRA comparado com MP de 57 cepas testadas do *M. tuberculosis*.

Drogas	Método Proporção	Resistente <i>n</i>	Sensível <i>n</i>	Sensibilidade %	Especificidade %	Acurácia %
R	Resistente	11	0	100	100	100
	Sensível	0	46			
H	Resistente	12	0	100	100	100
	Sensível	0	45			
S	Resistente	8	1	88,9*	98,0**	96,5
	Sensível	1	47			
E	Resistente	2	0	66,7***	100	98,2
	Sensível	1	54			

R: rifampicina; H: isoniazida; S: estreptomicina; E; etambutol

IC 95% = Intervalo de Confiança de 95%

*IC 95% (0,68 – 1,09)

**IC 95% (0,94 – 1,02)

***IC 95% (0,13 – 1,20)

Kappa = 0,87 (S) e 0,79 (E)

5 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

5.1 Critérios de inclusão: foram utilizadas todas as cepas identificadas como pertencentes à espécie *M. tuberculosis* e em cultura pura.

5.2 Critérios de exclusão: culturas contaminadas ou sem crescimento suficiente para realização dos testes.

5.3 Preparo das soluções teste

5.3.1 NRA

Como protocolos para os testes do NRA foi utilizado o “*Procedure Manual NRA do Institute of Tropical Medicine*”, Bélgica, 2009 e ÄNGEBY (2002).

O meio de cultura foi preparado conforme especificações do fabricante DIFCO™/BD *Löwenstein Medium Base* e incorporado com solução de KNO₃ (1,0 mg/ml) e com as soluções de uso das drogas, uma quantidade do meio foi preparada somente com solução de KNO₃, sem drogas para serem utilizados como controle de crescimento. O inóculo bacteriano foi ajustado na escala McFarland nº 1 e outra suspensão preparada a uma diluição 1:10 em solução tampão fosfato (PBS).

Para H, E e S foram preparadas soluções estoque de 10.000 µg/mL em água destilada estéril e duas diluições subseqüentes foram preparadas para atingir a concentração crítica da droga no meio. Para R foi utilizada somente solução estoque de 4.000 µg/mL em etilenoglicol e a partir desta utilizou-se volume adequado para atingir concentração crítica no meio. As concentrações críticas no meio LJ foram: 0,2 µg/mL para H, 40,0 µg/mL para R, 4,0 µg/mL para S e 2,0 µg/mL para E.

Para cada tubo de meio LJ com droga foi adicionado 200 µL da suspensão bacteriana nº 1 da escala McFarland e 200 µL da suspensão diluída 1:10 foi adicionada em três tubos de meio LJ sem droga, utilizados como controle de crescimento. Foi adicionado 500µL da solução reveladora após sete dias de incubação a 37°C: 1 parte 50% (v/v) de ácido clorídrico concentrado (HCl), 2 partes de 0,2% (p/v) de sulfanilamida e 2 partes 0,1%(p/v) de

dicloridrato de N-1 naftiletilenodiamino, em um dos tubos controle (sem drogas). Adicionou-se a solução reveladora nos tubos correspondentes com drogas quando ocorreu qualquer mudança de cor, de incolor para rosa. O tubo controle era descartado e os outros re-incubados se não ocorresse mudança de cor. O procedimento foi repetido após 10 dias com o segundo tubo controle, e havendo necessidade, após 14 dias com o terceiro tubo controle.

A cepa foi considerada resistente quando a cor do tubo com droga foi mais intensa que a cor desenvolvida no tubo controle que tinha a bactéria diluída a 1:10. A cepa foi considerada sensível quando não houve mudança de cor nos tubos com drogas.

5.3.2 REMA e MTT

Os procedimentos técnicos utilizados para realização do REMA foram retirados do “*Procedure Manual (REMA), Institute of Tropical Medicine*”, Bélgica, 2009 e Palomino (2002) e do MTT (ABATE *et al.*, 1998; MSHANA *et al.*, 1998). Para estas duas metodologias os protocolos utilizados foram semelhantes. As diferenças encontram-se no preparo das soluções dos corantes/soluções indicadores e na cor produzida após adição das mesmas nos orifícios das microplacas, quando há crescimento bacteriano.

Para os testes REMA e MTT foram utilizados as cepas proficiência de painel internacional para TS cedidas pela FUNED, mais a cepa ATCC H37Rv, sensível a todas as drogas e utilizada como controle dos testes, que se encontram no Quadro 2 com os respectivos resultados obtidos pelo MP.

Quadro 2: Perfis de sensibilidade das cepas de proficiência do *M. tuberculosis*

CEPAS	PERFIL DE SENSIBILIDADE
192	MDR
193	MDR
202	Resistente a S
213	MDR
230	MDR
445	Resistente a R e S
551	Resistente a H
639	Resistente a R
1008	XDR

1578	Resistente a H e S
1643	Resistente a R e S
1669	Resistente a H e S
1670	Resistente a H e S
1695	Resistente a R e S

Para a preparação do meio Middlebrook 7H9/OADC, pesou-se 0,94g do pó 7H9 e dissolveu-se em 180 ml de água destilada até completa solubilização. Foi acrescentado 20 ml de suplemento OADC e 1,0 ml de glicerol estéril após autoclavação a 121°C por 15 minutos e posterior resfriamento do meio. O meio foi homogeneizado, testou-se sua esterilidade após incubação a 37°C/24h e mantido a 4°C, protegido de luz direta, até sua utilização.

5.4 Preparo do inóculo: a partir de uma cepa do *M. tuberculosis*, recuperada de meio LJ com 21-28 dias de crescimento, foi realizado um subcultivo, retirando com alça bacteriológica descartável estéril uma quantidade representativa de bactérias e após adicionou-se em um tubo contendo 3,0 ml de 7H9/OADC. O meio foi incubado a 37°C por sete dias, após este período a suspensão foi homogeneizada e ajustada a turvação da escala McFarland nº 1.

5.5 Suspensão de uso: foi preparada uma diluição de 1:20 da suspensão padrão em meio 7H9/OADC. Para cada 10 ml, colocou-se 9,6 ml de meio e adicionou-se 0,4 ml da suspensão padrão misturando suavemente. O volume final desta suspensão de uso depende do volume necessário para o número de testes a serem realizados.

5.6 Preparo da solução estoque de drogas

H: foi pesado 2,0 mg e dissolvemos em 2,0 mL de água destilada estéril, esta solução constitui a solução estoque de 1000 µL/mL. A solução foi alíquotada e mantida a -20°C por três meses.

Solução de uso: com pipeta automática foi retirado 10 µL da solução estoque e adicionamos em 2490 µL de meio 7H9/OADC. Esta solução de trabalho corresponde a uma concentração igual a 4,0 µL/mL (4X), para que as concentrações ficassem entre 1,0 – 0,0312 µL/mL nos orifícios correspondentes da microplaca.

R: foi pesado 20 mg e dissolvido em 0,5 mL de metanol e depois de total dissolução completado o volume para 2,0 mL com água destilada. Esta solução constitui a solução estoque de 10 mg/mL.

5.7 Diluições da droga

Solução I = com pipeta automática foi coletada 250 μ L da solução estoque e adicionar em 2250 μ L de meio 7H9/OADC. A solução foi aliqotada e mantida a -20°C por três meses.

Solução II = solução de uso: foi coletada 20 μ L da solução I e adicionada em 2480 μ L de meio 7H9/OADC. Esta solução de trabalho correspondeu a uma concentração igual a 8,0 $\mu\text{L/mL}$ (4X), para que as concentrações ficassem entre 2,0 – 0,0625 $\mu\text{L/mL}$ nos orifícios correspondentes da microplaca.

5.8 Preparo das soluções reveladoras

Resazurina: o preparo da solução a 0,01% de resazurina foi realizado por intermédio da pesagem de 0,002 g e solubilizada em 20 mL em água destilada estéril.

MTT: foi preparada uma solução de 1,0 mg/mL de MTT em etanol e uma solução de Tween 80 a 10% e após fez-se uma mistura vol/vol.

As soluções foram conservadas a 4°C por uma semana e protegidas da luz.

5.9 Preparo das microplacas: Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 orifícios, fundo em U e com tampa.

- foram adicionados 100 μ L do meio 7H9/OADC em todos os orifícios, com exceção dos orifícios externos, que foi colocado 200 μ L de água destilada estéril para evitar evaporação durante a incubação.
- nos orifícios da primeira linha da microplaca foram adicionados 100 μ L de soluções da maior concentração das drogas e após, as diluições seriadas foram realizadas na própria placa com auxílio de pipeta multicanal, passando 100 μ L de um orifício para o outro. Foram obtidos desta forma as diluições subseqüentes (1:2). No último orifício os 100 μ L finais foram desprezados.

- depois adicionou-se 100 μ L da suspensão bacteriana diluída a 1:20 em todos os orifícios.
- para cada microplaca foi utilizado orifício sem droga para controle de crescimento e outro sem suspensão bacteriana para controle de esterilidade do teste.
- as placas foram fechadas com a tampa e seladas com fita crepe, para vedação total e incubadas a 37°C por 10 dias.
- após o décimo dia foi adicionado nos orifícios controle, os respectivos indicadores: 30 μ L de solução de REMA e 50 μ L de solução de MTT/solução Tween 10%.
- no dia seguinte, havendo mudança de cor, viragem dos indicadores nos orifícios controles, para REMA de azul para rosa e MTT de amarelo para púrpura/azul escuro, foi adicionado a solução dos indicadores em todos os orifícios com drogas. As microplacas foram re-incubadas por mais 24 h a 37°C.

O MIC foi determinado como a menor concentração da droga que impediu o crescimento visível da bactéria, isto é, capaz de impedir a mudança de cor nos poços correspondentes das diluições.

5.10 Concentrações utilizadas para cada droga e seus respectivos *cut-off* (pontos de corte). (“*Procedure Manual*”, REMA, do *Institute of Tropical Medicine*, Bélgica, 2009).

H = (1,0 – 0.0312) μ g/ml ***cut-off*: 0,25 μ g/ml**
 Diluições: (1,0 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 -0,0312) μ g/ml

R = (2,0 – 0.0625) μ g/ml ***cut-off*: 0,5 μ g/ml**
 Diluições: (2,0 – 1,0 – 0,5 - 0,25 – 0,125 – 0,0625) μ g/ml

5.11 Interpretação dos resultados

Para H: MIC \geq 0,25 μ g/mL - resistente
 MIC < 0,25 μ g/mL - sensível

Para R: MIC \geq 0,50 μ g/mL - resistente
 MIC < 0,50 μ g/mL - sensível

Foi anotado simultaneamente à observação da reação o tempo gasto para o seu resultado final.

5.12 Cálculos estatísticos: foram realizados pelo programa “Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos, versão 1999” (BRAILE; GODOY, 1999).

6 RESULTADOS MÉTODOS MTT e REMA

Na tabela 3 estão demonstrados os resultados dos MICs da R e H obtidos pelo método MTT.

Tabela 3: Resultados dos MICs de isoniazida e rifampicina pelo método MTT

N^{os}	ISONIAZIDA (MIC)	RIFAMPICINA (MIC)
ATCC	< 0,0312 µg/mL	< 0,0625 µg/mL
1008 XDR	= 1,0 µg/mL	= 2,0 µg/mL
193 MDR	= 1,0 µg/mL	= 2,0 µg/mL
213 MDR	= 1,0 µg/mL	= 2,0 µg/mL
1670 (H e S)	= 1,0 µg/mL	< 0,0625 µg/mL
1578 (H e S)	= 1,0 µg/mL	< 0,0625 µg/mL

MIC= Concentração Inibitória Mínima.

Os resultados relacionando o MIC em relação à R e H pelo método do MTT mostrou que das 14 cepas de proficiência nove foram excluídas, três por contaminação (445,1643,1695) e seis por crescimento insuficiente (192,202,551,639,230,1669) restando cinco cepas para o estudo (tabela 3). Assim, a concordância foi de 100% para ambas as drogas R e H.

Na tabela 4 estão demonstrados os resultados dos MICs da R e H obtidos pelo método REMA.

Tabela 4: Resultados dos MICs de isoniazida e rifampicina pelo método REMA

N ^o s	ISONIAZIDA (MIC)	RIFAMPICINA (MIC)
ATCC	< 0,0312 µg/mL	< 0,0625 µg/mL
551 (H)	= 1,0 µg/mL	< 0,0625 µg/mL
1008 XDR	= 1,0 µg/mL	= 0,5 µg/mL
1669 (H e S)	= 1,0 µg/mL	< 0,0625 µg/mL
192 MDR	= 1,0 µg/mL	= 2,0 µg/mL
193 MDR	= 0,25 µg/mL	= 0,50 µg/mL
202 (S)	< 0,0312 µg/mL	= 2,0 µg/mL
		DISCORDANTE
445 (R e S)	=1,0 µg/mL DISCORDANTE	= 2,0 µg/mL
1578 (H e S)	= 0,0625 µg/mL DISCORDANTE	= 0,125 µg/mL
1643 (R e S)	=1,0 µg/mL DISCORDANTE	= 2,0 µg/mL
1695 (R e S)	= 1,0 µg/mL DISCORDANTE	= 2,0 µg/mL
1670 (H e S)	= 0,25 µg/mL	= 0,50 µg/mL DISCORDANTE

MIC= Concentração Inibitória Mínima.

Das 14 cepas de proficiência duas foram excluídas por crescimento insuficiente (230,639), restando 12 cepas para o estudo (tabela 4).

Os resultados relacionando o MIC da R e H pelo REMA foram:

Para R: sensibilidade, especificidade e acurácia de 100, 60 e 83,3% respectivamente, e uma boa concordância ($\kappa = 0,64$) quando comparado com o MP (n = 12).

Para H: sensibilidade, especificidade e acurácia para H de 100, 50 e 83,3% respectivamente, e uma moderada concordância ($\kappa = 0,57$) quando comparados com o MP (n = 12).

As figuras 8 e 9 mostram os métodos MTT e REMA de cepas sensíveis e resistentes a R e H com seus respectivos MICs (Linha B a G: 2,0 – 1,0 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 – 0,0312 $\mu\text{g/mL}$).

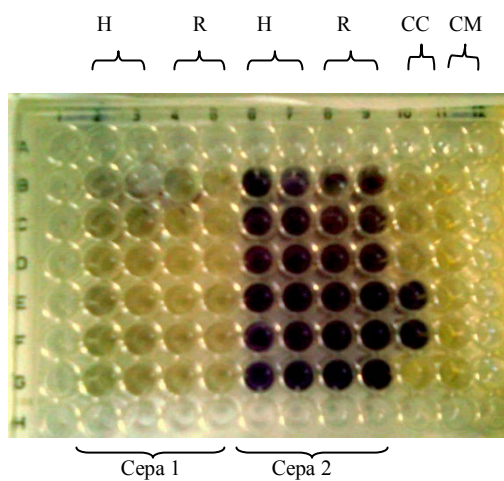


Figura 8 - Método MTT

Cepa 1: sensível a H e R
 Cepa 2: resistente a H e R (todas as diluições)
 CC: controle de crescimento

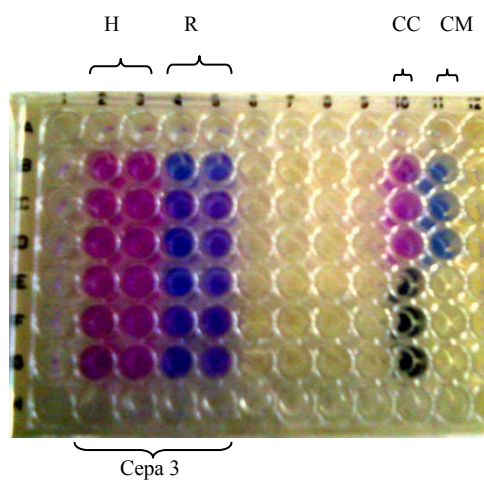


Figura 9 - Método REMA

Cepa 3: resistente a H e sensível a R
 CM: controle de esterilidade do meio

O tempo médio de leitura dos resultados foi de 10 dias (7 a 15 dias).

7 DISCUSSÃO

A avaliação de métodos quantitativos para drogas anti-tuberculosas permite avaliar de modo mais acurado o nível de resistência das principais drogas utilizadas no tratamento da TB, o valor do MIC determina os pontos de corte e gera resultado quantitativo, determinando se uma cepa possui altos ou baixos níveis de resistência à determinada droga (NCCLS, 2003).

Os estudos que propuseram a utilização do MTT como teste de baixo custo e acurado descreveram excelente concordância com o MP. ($\kappa = 1,00$) para H e R (ABATE *et al.*, 1998 e 2004; CAVIEDES *et al.*, 2002).

Neste estudo os resultados do método MTT quando comparados com o MP teve concordância de 100% quando analisadas a R e a H separadamente, porém houve diminuição da concordância para 60%, devido ao menor número de cepas avaliadas, quando realizado com cepas MDR e XDR, o que não foi evidenciado em outros estudos.

O desempenho do MTT foi avaliado por MSHANA (1998) somente para R, sendo a metodologia realizada em tubos, com volume maior de meio de cultura, e a leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda 620 nm. Neste estudo a metodologia foi realizada em microplacas, que utiliza menor quantidade de meio, com volume final de 200 μL , o que dificultou o crescimento e a concentração do inoculo foi diferente, e com leitura realizada de modo visual.

Alguns autores realizaram o teste direto da amostra frente a R pelo MTT, obtendo resultados de 90,5% para sensibilidade e 100% para especificidade, porém de 100 amostras testadas 22 foram excluídas por contaminação. Neste estudo não foi realizado o MTT direto da amostra e a contaminação das culturas foi observada em 21,4% (3/14) (WOLDEMESKEL *et al.*, 2005).

Neste estudo os resultados do método REMA para R tiveram uma alta sensibilidade, baixa especificidade e boa concordância ($\kappa=0,64$) com o MP. Para a H também houve uma alta sensibilidade, baixa especificidade e uma moderada concordância ($\kappa=0,57$). As cepas MDR e XDR entretanto apresentaram melhor concordância (80%). Em trabalho anterior obteve-se 100% de concordância percentual para R e para H 97,3%, respectivamente, com excelente capacidade para diferenciar cepas resistentes das sensíveis (PALOMINO *et al.*, 2002), o que não aconteceu com os resultados deste trabalho.

A meta-análise, de 18 estudos de REMA e MTT, frente às drogas R e H, 11 relataram sensibilidade e especificidade de 100%, quatro estudos com sensibilidade e especificidade acima de 95%, dois estudos acima de 90% e somente um relatou sensibilidade de 89% e especificidade de 98% (MARTIN; PORTAELS; PALOMINO, 2006). No atual estudo a concordância com o MP foi somente para a sensibilidade.

A OMS espera como meta de desempenho para os laboratórios, eficiência (acerto no total dos resultados) de 97% para H e de 99% para R. Os limites de aceitabilidade de concordância estabelecidos classificam como não aceitáveis, as concordâncias abaixo de 89% para H e de 95% para R, assim neste trabalho os resultados estão aquém do padronizado.

Os resultados discordantes observados neste estudo podem ser devido a não padronização do inóculo que pode ser diluída à 1:20 ou 1:25 a partir de escala Mc Farland nº1 ou ainda utilizando escala McFarland nº 3. Além da preparação do mesmo, que pode ser direto das colônias ou em subcultivo em 7H9 por sete dias a 37°C para atingir a fase *log* de crescimento (FERRARI; LUCA *et al.*, 2010; MARTIN; PALOMINO, 2009; MONTORO *et al.*, 2005; MS, 2008; MSHANA *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2004; SANCHOTENE *et al.*, 2008).

As cepas de referência na sua maioria eram resistentes (quatro MDR, uma XDR, quatro resistentes somente a H e quatro somente a R), o que pode ter influenciado na demora do tempo de crescimento, pois isolados resistentes, particularmente a H, crescem mais lentamente, como resultado da diminuição de atividade da catalase-peroxidase. O MTT não permitiu a avaliação de H (MSHANA *et al.*, 1998; ABATE *et al.*, 1998). Observa-se menor atividade metabólica do *M. tuberculosis* quando elas apresentam mutações, através da expressão do gene *rpoB* em cepas resistentes a R (INDERLIED; SALFINGER, 1999).

O MTT possui maior facilidade para visualização da mudança de cor, pela troca do amarelo para roxo, sem possibilidades de nuances de cores, que pode ocorrer no método REMA, como observado neste estudo, conforme também relatado por Ribeiro (2004).

O tempo de obtenção dos resultados do presente estudo (média de 10 dias) foi maior que a maioria dos estudos, que relataram sete dias, porém outros trabalhos relataram problemas similares, apontando como provável causa, a característica intrínseca do *M. tuberculosis*, que apresenta tempo de crescimento em meio de cultura muito variável (MOSCA; TELLES, 2000).

Devido ao pequeno número de cepas testadas, dificuldade de crescimento, o que acontece também com o MP e contaminações podem ter influenciado nos resultados. Assim, maior número de cepas (cepas resistentes e somente cepas sensíveis), uso dos testes em rotina e avaliação dos custos devem ser efetuadas, para poder realizar análises estatísticas adequadas e determinação de pontos de cortes (MICs) precisos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral do estudo foi avaliar o perfil fenotípico de cepas do *M. tuberculosis* frente aos anti-tuberculosos (R, H, S e E), para o método NRA (*Nitrate Reductase Assay*), e os métodos REMA (*Resazurin Microtiter Assay Plate*) e o MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) frente a R e H, comparando com o MP.

Dificuldades encontradas:

I – NRA

- crescimento insuficiente de bactérias no meio LJ para atingir a escala de McFarland nº 1.

II – MTT e REMA

- crescimento insuficiente de bactérias no meio LJ para atingir a escala de McFarland nº 1.
- contaminação das microplacas quando se utilizou filme plástico para vedação das mesmas, o problema foi parcialmente solucionado quando utilizamos somente microplacas com tampa.
- dificuldades de leitura e interpretação na viragem de cor do azul para rosa em cepas resistentes no teste REMA, devido às nuances de cor entre o azul e rosa.
- reagente químico não apresentou-se na cor determinada. O problema foi solucionado após troca do reagente.

9 PERSPECTIVAS

Introduzir no Laboratório de Micobactéria do HC/UFMG teste de sensibilidade pelo método NRA a partir de cultura e diretamente de amostras clínicas com baciloscopia positiva.

Realizar número maior de testes com novas cepas de referência e cepas do *M. tuberculosis* recuperadas de isolados clínicos (métodos REMA e MTT) para aprimoramento e aperfeiçoamento desta técnica, como a padronização do inóculo.

Capacitar profissionais da área laboratorial para a realização dos testes de sensibilidade.

REFERÊNCIAS

- ABATE G. *et al.* Direct Colorimetric Assay for Rapid Detection of Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 2, p. 871-873. 2004.
- ABATE G.; MSHANA R.N.; MIORNER H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.2, p. 1011-1016. 1998.
- AFFOLABI D. *et al.* Evaluation of Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Rifampicin Resistance by a Nitrate Reductase Assay Applied to Sputum Samples in Cotonou, Benin. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 7, p. 2123-2125. 2007.
- AFFOLABI D. *et al.* Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Cotonou (Benin) using two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. **J Clin Microbiol**, v. 57, p. 1024-1027. 2008.
- ÄNGEBY K.A.; KLINTZ L.; HOFFNER S.E. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 553-555. 2002.
- BARON E.J.; PETERSON L.R.; FINEGOLD S.M. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 9^a ed, St Louis, Mosby. 1994.
- BARRERA L y MONTORO E. Consideraciones sobre la implementación de nuevas herramientas diagnósticas en las redes de laboratorios de tuberculosis de Latinoamérica. **Rev Cubana Med Trop**, v. 59, n.2. 2007.
- BLANCHARD J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p. 215-239. 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico Epidemiológico**, ano 9, nº 2, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Brasília, DF 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Tuberculose no Brasil Avanços e Perspectivas, 2010**.
- 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, 2010**.

BRASIL. Organização Pan-Americana da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública – CGLAB/SVS/MS e Laboratório Central do Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo. 2008.

BRASIL. SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. Epidemiologia da Tuberculose em Minas Gerais. Coordenação Estadual de Pneumologia Sanitária-SE/SES-MG/SUS. 2010.

BRITO R.C. *et al.* Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. **J Bras Pneumol**, v.30, n.4, p. 425-432. 2004.

CANETTI G. *et al.* Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. **Bulletion of the World Health Organization**, v.4, p.21-43. 1969.

CAVIEDES L.; DELGADO J.; GILMAN R.H. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 40, n.5, p.1873-1874. 2002.

COLE S.T. *Mycobacterium tuberculosis*: drug resistance mechanisms. **Trends Microbiol**, v. 2, n.10, p.411-5. 1994.

DALCOLMO M.P.; ANDRADE M.K.N.; PICON P.D. Tuberculose Multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Rev Saúde Pública**, v. 41, n.1, p.34-42. 2007.

EUCO-Net HIV/TB workshop in South Africa. July 23-24, 2009. Disponível em <http://www.euco-net.eu/index.php?id=11327>. Acesso em 4 out. 2010.

FERRARI M.L.*et al.* Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line antimycobacterial agents in a Brazilian hospital: assessing the utility of the tetrazolium (MTT) microplate assay. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.5, p. 661-664. 2010.

FRIEDEN T.R. *et al.* The Emergence of Drug-Resistant Tuberculosis in New York City. **N Engl J Med**, v.328, n.2, p.521-526. 1993.

GANDHI N.R. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. **Lancet**, v. 4, n.368 (9547), p.1554-6. 2006.

GILLESPIE S.H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.2, p.267-274. 2002.

HEIFETS L.B., CANGELOSI G.A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.3 n.7, p.564-581. 1999.

HEYM B. *et al.* Characterization of the *kat G* Gene Encoding a Catalase-Peroxidase Required for the Isoniazid Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.13, p. 4255-4259. 1993.

INDERLIED C B & SALFINGER M. Antimycobacterial Agents and Susceptibility Tests. *In* MURRAY PR.; BARON E.J.; PFALLER M.A.; TENOVER F.C.; YOLKEN R.H. Manual of Clinical Microbiology. 7th Edition. **American Society for Microbiology**: Washington, D.C, p. 1601-23. 1999.

KENT, P. T.; KUBICA G. P. **Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory**, p. 96–103. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga.1985.

KONEMAN E.W. *et al.* Diagnóstico Microbiológico-Texto e Atlas Colorido. 5^a ed. Rio de Janeiro: MEDSI. 2001. Cap 1, p. 32.

KONEMAN E.W. *et al.* Diagnóstico Microbiológico-Texto e Atlas Colorido. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. Cap. 19, p.1057-1118.

KRITSKI A.L. Emergência de tuberculose resistente: renovado desafio. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n.2, p. 157-158. 2010.

KUMAR M. *et al.* Microplate nitrate reductase assay versus Alamar Blue assay for MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 8, n.8, p. 939-941. 2005.

LEMUS D. *et al.* Nuevos métodos para la detección rápida de la Resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*, **Biotecnología Aplicada**, v.23, n. 3, p. 306-308. 2005.

LIU D. A Rapid Biochemical Test for Measuring Chemical Toxicity. **Bull. Environm. Contam. Toxicol**, v.26, p.145-149. 1981.

MARTIN A & PALOMINO P.C. PROCEDURE MANUAL – *Nitrate Reductase Assay* (NRA): Drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. **Institute of Tropical Medicine, Mycobacteriology Unit, Antwerp, Belgium**. Version 02-2009.

MARTIN A & PALOMINO P.C. PROCEDURE MANUAL – *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) – Colorimetric redox indicator (CRI) - Drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. **Institute of Tropical Medicine, Mycobacteriology Unit, Antwerp, Belgium**. Version 03-2009.

MARTIN A.; PORTAELS F.; PALOMINO JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, p. 175-183. 2006.

MENGATTO L.; CHIARI Y.; IMAZ M.S. Evaluation of Rapid alternative methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.5, p.535-542. 2006

MITCHISON D.A & NUMM A.J. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. **Am Rev Respir Dis**, v.133, p.423-30. 1986.

MONTORO E. *et al.* Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and resazurin microtiter assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother**, v.55, p.500-505. 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol. Methods**, v.65, p.55-63. 1993.

MSHANA R.N. *et al.* Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for rapid detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 36, n.5, p.1214-1219. 1998.

MURRAY P.R. *et al.* **Microbiologia Médica**, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009. Cap 29, p.289-302.

MUSA H.R. *et al.* Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy positive sputum samples. **J Clin Microbiol**, v 43, p.3159-3161. 2005.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standard**. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada – Sexta Edição, M7-A6, v, 23.2003.

NOTICE to readers: revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. **MMWR – Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.55, n.43, p.1176, 2006 Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5543a4.htm>>. Acesso em: 19 dez. 2010.

PALMERO D.J. Pautas latinoamericanas de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis farmacorresistente. **Salud(i)Ciencia**, v.16, n.1, p.1366-1375.2008.

PALOMINO J.C.; ANANDI M.; PORTAELS F. Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods, **Clin Microbiol Infect**, v.13, p. 754-762. 2007.

PANAIOTOV S & KANTARDJIEV T (2002). Nitrate reductase assay for drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v.40, n.10, p.3881-3882. 2002.

RIBEIRO M.O. *et al.* Avaliação de testes rápidos microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **J Bras Pneumol**, v.30, n.4, p.455-460. 2004.

ROCHA J.L. *et al.* Tuberculose Multirresistente. **Pulmão R J**, v.17, n.1, p. 27-32. 2008.

ROSSETTI M.L.R.; SILVA M.S.N.; RODRIGUES V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Rev Saúde Pública**, v. 36, n.4, p. 525-532. 2002.

SANCHOTENE K.O. *et al.* Comparative evolution of the nitrate reductase assay and the resazurin micrititre assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, against first line anti- tuberculosis drugs. **Brazilian J of Microbiol**, v.39, p.16-20. 2008.

SOLIS L.A. *et al.* Validation of a rapid method for detection of M tuberculosis resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Peru. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 9, n.7, p. 760-764. 2005.

SPINDOLA DE MIRANDA S. *et al.* Incidência de TB diagnosticada no pronto-atendimento de um hospital escola na região sudeste do Brasil. **J Bras Pneumol**, v. 35, n.2, p.174-178. 2008.

TELENTI A. *et al.* Direct, Automated Detection of Rifampin - Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformayion Polymorphism Analysis, **Antimicrob Agents Chemother**, v.37, n.10, p.2054-2058. 1993.

TELLES M.A.S.; MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 59, n.(1/2), p.15-19. 2000.

TORTORA G.J.; FUNKE B.R.; CASE C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre. Artmed. 2000. Cap. 24, p. 630-657.

VALRELDZIS B.P. *et al.* Drug-resistant-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization Recommendations. **Tuber Lung Dis**, v.75, p. 1-7. 1994.

VIRTANEN. S. A study of nitrate reduction by mycobacteria. **Acta Tuberc. Scand.** Suppl. v.48, p.78-82. 1960.

WELLS C.D. Global Impact of Multidrug-Resistant Pulmonary Tuberculosis Among HIV-Infected and Other Immunocompromised Hosts: Epidemiology, Diagnosis and Strategies for Management. **Curr Infect Dis Rep** DOI 10.1007/s11908-010-0104-5. Published online: 28 March 2010.

WHO. World Health Organization. **Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010 GLOBAL REPORT ON SURVEILLANCE AND RESPONSE.** (document: WHO/HTM/TB/2010.3)

WHO. World Health Organization. **THE STOP TB DEPARTAMENT. TUBERCULOSIS MDR-TB & XDR-TB. THE 2008 REPORT.**

WHO. World Health Organization. **Weekly epidemiological record n° 9;** 2010, 85, 69-80.

WHO. World Health Organization. **Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994-1997.** Switzerland:1997. Geneva. (WHO/TB/97.229).

WHO. World Health Organization. **Anti-tuberculosis drug resistance in the world:the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance,1994-1997.** WHO/TB/97.229. Geneva, Switzerland, 1997.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis-4thed World Health Organization,** 2009, (document: WHO/HTM/TB/2009.422).

WHO. World Health Organization. **NON-COMMERCIAL CULTURE AND DRUG-SUSCEPTIBILITY TESTING METHODS FOR SCREENING OF PATIENTS AT RISK OF MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS.** July 2010.

WILLIAMS D.L. *et al.* Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, p.2380-2386. 1994.

WOLDEMESKEL D. *et al.* Evaluation of a direct colorimetric assay for rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Ethiop J Health Dev**, v.19, n.1, p. 51-54. 2005.

YAJKO D.M. *et al.* Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin microbiol**, v.33, n.9, p.2324-2327.1995.

ZHANG Y. *et al.* The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of *M. tuberculosis*. **Nature**, v.385, p.591-593. 1992.

ANEXOS

Anexo A – Pareceres Éticos

Câmara Departamental – Clínica Médica



PARECER CLM-078-08

Belo Horizonte, 14 de outubro de 2008

Título do projeto: Avaliação de testes fenotípicos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* frente aos antituberculosos.

Investigador: Profa. Dra. Silvana Spíndola de Miranda

Histórico: Em 02/10/08 foi solicitado parecer de projeto enviado à Câmara do Departamento de Clínica Médica em 01/10/08, de responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Spindola de Miranda, com os seguintes documentos: 1) projeto de pesquisa modelo COEP, 2) aprovação do COEP-UFMG ao projeto de pesquisa "Estudo bacteriológico e imunológico de pacientes portadores de *Mycobacterium tuberculosis* associados ou não ao vírus de imunodeficiência humana" (Parecer no 162/01 de 06/11/2001), 3) termo de anuência da Unidade Funcional Patologia e Medicina Laboratorial, 4) carta de anuência em participar da pesquisadora colaboradora, Dra. Wânia da Silva Carvalho e 5) currículo da Dra. Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur.

Do mérito: Projeto de pesquisa dentro da linha de pesquisa desenvolvida pela Profa. Silvana, com envolvimento de aluna que participará de processo de seleção para pós-graduação. A tuberculose é um problema de saúde pública no país, 4ª causa de morte por doenças infecciosas, que tem como agravante altos índices de resistência aos medicamentos preconizados em seu tratamento. Evitar a seleção de resistência é uma das prioridades no tratamento da tuberculose. Os testes de sensibilidade das cepas de pacientes aos agentes antimicrobianos são ferramentas fundamentais nesta tarefa. Entretanto, estudos internacionais têm mostrado grandes disparidades dos testes de sensibilidade no que diz respeito à concordância inter-laboratorial, confiabilidade e sensibilidade dos mesmos. Este projeto tem por objetivos avaliar o perfil fenotípico e a eficácia de diferentes modelos de fenotipagem de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes atendidos no ambulatório do HC-UFMG.

Parecer: Pela aprovação pela Câmara do Departamento de Clínica Médica.

PARECER APROVADO PELA CÂMARA DEPARTAMENTAL DO CLM, EM 15/10/08

Prof. José Carlos Bruno da Silveira
 Chefe do Departamento de Clínica Médica
 Presidente da Câmara Departamental

Prof. José Carlos Bruno da Silveira
 Chefe do Depto. de Clínica Médica
 Insc. UFMG 07596-5 - SIAPE 0320322-2

COEP

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 618/08

**Interessado(a): Profa. Silvana Spíndola de Miranda
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de março de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação de testes fenotípicos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* frente aos antituberculosos**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Marques Amaral".

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

DEPE

Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 06 de abril de 2009.

PROCESSO: Nº 165/08

TÍTULO: "AVALIAÇÃO DE TESTES FENOTÍPICOS DE CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FRENTE AOS ANTITUBERCULOSOS"

SR(A) PESQUISADOR(A):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 27/03/2009, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE **relatório** parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

PROF. HENRIQUE VITOR LEITE
Diretor da DEPE/HC-UFMG

À Sr^a.
Prof. Silvana Spíndola de Miranda
Clínica Médica
Faculdade de Medicina/UFMG

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO

Projeto: Estudo Bacteriológico e Imunológico de pacientes portadores do Mycobacterium tuberculosis associados ou não ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Número da Ficha:

Instituição:

A Professora Silvana Spíndola, professores colaboradores e profissionais de Saúde da Universidade Federal de Minas Gerais estão fazendo uma pesquisa para saber se o Senhor está infectado ou está doente pelo bacilo da tuberculose, além de uma avaliação imunológica. Caso o Senhor consinta, nós coletaremos seus dados através de um questionário, faremos um teste em seu antebraço esquerdo (teste de Mantoux/PPD), que deverá ser lido após 72 a 96 horas e coletaremos 20 ml de seu sangue e/ou outros materiais clínicos como, por exemplo, escarro se for necessário para seu diagnóstico. O Senhor não pagará nenhuma quantia em dinheiro para a participação neste estudo ou para seu tratamento caso necessário, o qual será gratuitamente oferecido para o tratamento da doença em estudo (tuberculose).

Caso o Senhor recuse a participar do estudo em qualquer momento, a continuidade de sua avaliação e tratamento se necessário estará garantida.

CONFIDENCIABILIDADE DOS DADOS

A participação em projetos de pesquisa podem resultar em perda de privacidade, entretanto procedimentos serão tomados pelos responsáveis deste estudo, no intuito de proteger a confiabilidade das informações que o Sr. forneça. As informações serão codificadas e mantidas em local reservado, somente os pesquisadores e seus assistentes terão acesso as informações transcritas dos questionários para os arquivos no computador. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida. Os questionários posteriormente serão destruídos.

CONSENTIMENTO

Concordo em participar desta pesquisa. Eu receberei uma cópia deste consentimento para mantê-lo comigo.

COMENTÁRIO FINAL DO ENTREVISTADOR

Obrigado pelo interesse em participar neste estudo respondendo este questionário com já foi esclarecido anteriormente.

Nome do paciente e assinatura

Nome do entrevistador e assinatura

Endereço: Rua Alfredo Balena, 190 Faculdade de Medicina/Ambulatório Bias Fortes de Pneumologia/Tisiologia. (segunda e sexta das 14 às 16h, terça e quinta das 8 às 12h, 5º andar) Telefone de contato: Profa. Silvana 99554845/32489599

Anexo C – Ata de defesa de dissertação de mestrado



CENTRO DE POS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **MARIA DE FÁTIMA FILARDI OLIVEIRA MANSUR** nº de registro 2009659036. Às quatorze horas do dia **dezoito de março de 2011**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação aprovada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DE TESTES FENOTÍPICOS DE CEPAS DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FRENTE AOS ANTITUBERCULOSOS, ISOLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM HOSPITAL GERAL, BELO HORIZONTE, BRASIL”**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Silvana Spindola de Miranda, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado definitivo. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Silvana Spindola de Miranda /Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Wânia da Silva Carvalho/Coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Afrânio Lineu Kritski	Instituição: UFRJ	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Ênio Roberto Pietra Pedroso	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de março de 2011.


Profa. Silvana Spindola de Miranda/Orientadora Silvana Spindola de Miranda
 Profa. Wânia da Silva Carvalho/Coorientadora Wânia da Silva Carvalho
 Prof. Afrânio Lineu Kritski Afrânio Lineu Kritski
 Prof. Ênio Roberto Pietra Pedroso Ênio Pietra
 Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari/Coordenadora Teresa

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador


Prof. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
Coord. PG. em Ciências Aplicadas
à Saúde do Adulto
Faculdade de Medicina / UFMG

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

Anexo D – Declaração de aprovação

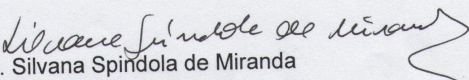

 UFMG

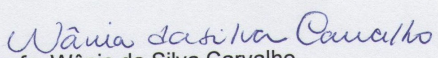
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
 Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
 Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
 Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640

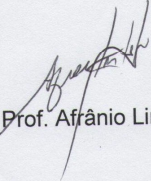


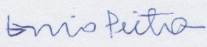
DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Silvana Spindola de Miranda, Wânia da Silva Carvalho, Afrânio Lineu Kritski e Ênio Roberto Pietra Pedroso, aprovou a defesa de dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DE TESTES FENOTÍPICOS DE CEPAS DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FRENTE AOS ANTITUBERCULOSOS, ISOLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM HOSPITAL GERAL, BELO HORIZONTE, BRASIL”**, apresentada pela mestranda **MARIA DE FÁTIMA FILARDI OLIVEIRA MANSUR**, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 18 de março de 2011.


 Profa. Silvana Spindola de Miranda
 Orientadora


 Profa. Wânia da Silva Carvalho
 Coorientadora


 Prof. Afrânio Lineu Kritski


 Prof. Ênio Roberto Pietra Pedroso

APÊNDICE

Apêndice A - Questionário

1. Data:

1 – Identificação:

2. Nome do Paciente:

3. N° Registro:

4. N° Registro caderno:

5. Data de nascimento:

6. Idade: anos.

7. Nome da Mãe:

8. Naturalidade:

9. Estado:

10. Endereço:

11. Telefone: 12. Celular:

13. Sexo:

0. () Masculino

1. () Feminino

14. Raça/IBGE declarada:

0. () Branca; 1. () Preta; 2. () Parda; 3. () Amarela; 4. () Indígena; 5. () Outra;

15. Raça/IBGE julgada pelo entrevistador:

0. () Branca; 1. () Preta; 2. () Parda; 3. () Amarela; 4. () Indígena; 5. () Outra;

16. Estado civil:

0. () Casado; 1. () Solteiro; 2. () Relação estável Hetero; 3. () Relação estável Homo; 4. () Separado; 5. ()

Desquitado/divorciado; 6. () Outro;

17. Local de residência nos 2 últimos anos:

18. Quantas pessoas moram na casa incluindo o(a) senhor(a)?

19. Filhos? 0. () não; 1. () sim;

20. Quantos Filhos?

21. Quantas pessoas dormem no mesmo quarto?

22. Profissão:

23. Está empregado?

0. () não; 1. () Empregado; 2. () Autônomo;

24. Ocupação atual:

25. Ocupação passada:

26. Renda Familiar:

0. () até meio SM; 1. () de meio a 1 SM; 2. () de 1 a 2 SM; 3. () de 2 a 3 SM; 4. () de 3 a 5 SM; 5. () de 5 a 10 SM; 6. () de 10 a 20 SM; 7. () mais de 20 SM; 8. () não sabe;

27. Atividade sexual:

0. () Heterossexual; 1. () Homossexual; 2. () Bissexual; 3. () UDI; 4. () Hetero, + de 5 parceiros ano; 5. ()

Relação com sabidamente HIV; 6. () Hetero + hist. De contato com prostituta; 7. () Hemotransfusão de 83 em diante; 8. ()

Parceiro com hist. De + de 5 parceiros; 9. () Mulher com parceiro Homo/Bissexual; 10. () Parceiro teve relação com

prostituta; 11. () Mais de uma resposta; 12. () Desconhecido;

28. História pregressa de DST:

0. () HIV; 1. () Sífilis; 2. () HPV; 3. () Clamídia; 4. () Tricomoníase; 5. () Condiloma acuminado; 6. ()

Cancro mole; 7. () Linfgranuloma venéreo; 8. () Danovanose; 9. () Não;

29. História de contato:

0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;

30. Tipo de contato:

0. () Familiar nos últimos 2 anos; 1. () Familiar há mais de 2 anos; 2. () Profissional nos últimos 2 anos; 3. ()

Profissional há mais de 2 anos; 4. () Social nos últimos 2 anos (rua, ônibus); 5. () Social há mais de 2 anos; 6. () Hospitalar

nos últimos 2 anos; 7. () Hospitalar há mais de 2 anos;

31. Data do contato:

32. Tempo transcorrido entre o contato e a doença:

33. Tempo de contato com tuberculoso:

0. () Diário; 1. () Diário intermitente; 2. () Semanal; 3. () Quinzenal; 4. () Eventual; 5. () não sabe; 6. ()

Nenhuma das anteriores;

34. Realizou quimioprofilaxia prévia ou fez uso de isoniazida:

0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;

35. Data do início da quimioprofilaxia:

36. Data do término da quimioprofilaxia:

37. Teve tuberculose anteriormente?

0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;

38. Quantas TB anteriores?

0. () uma; 1. () duas; 2. () três; 3. () quatro; 4. () cinco; 5. () mais que cinco;

39. Ano do diagnóstico da TB anterior:

40. Localização da TB anterior:

0. () Pulmonar cavitária; 1. () Pulmonar não cavitária; 2. () Pulmonar não específica; 3. () Pleural; 4. () Intestinal; 5. () Linfonodal; 6. () Meninges; 7. () Peritoneal; 8. () Hepática; 9. () Renal; 10. () Miliar; 11. () Ocular externa (palpebral, orbitária, conjuntival); 12. () Ocular interna (trato uveal); 13. () não localizada;

41. Como foi feito o diagnóstico anterior:

0. () não sabe; 1. () Escarro positivo; 2. () Biópsia positiva; 3. () Cultura positiva; 4. () Cl+RX+TT+ tto de prova; 5. () Clínico + tto de prova; 6. () Clínico + Rx + tto de prova; 7. () TC + tto de prova; 8. () US + tto de prova; 9. () outros.

42. Local do último tratamento:

43. Data de início do último tratamento:

44. Data do término do último tratamento:

45. Duração do último tto:

46. Data de admissão do último tto:

47. Data da alta do último tto:

48. Tempo de vínculo ao serviço último tto:

49. Fez uso de medicamentos:

0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;

50. Qual medicamento?

0. () Isoniazida; 1. () Rifampicina; 2. () Estreptomicina; 3. () Etambutol; 4. () PZA; 5. () Rifabutina; 6. () Amicacina; 7. () Cipro/Ofloxacin; 8. () Clofazima; 9. () Atropina (sol. oftálmica, pomada); 10. () Mydracyl (sol. oftálmica); 11. () Fenilefedrina (sol. oftálmica); 12. () Dexametasona (suspensão, pomada); 13. () Prednisolona (sol. Oftálmica, suspensão); 14. () Prednisona oral

51. Fez uso correto da medicação?

0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;

52. Teve alguma complicação com a medicação?

0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;

53. Qual a cor do comprimido/injeção?

0. () Brancos; 1. () Vermelhos; 2. () Azuis; 3. () Rosas; 4. () Injetáveis;

54. Diagnóstico de alguma outra infecção pulmonar?

0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;

55. Qual patógeno?

0. () Micobacteria não tuberculosa; 1. () Pneumocistose; 2. () Bacteriana; 3. () Fúngica;

56. Data do diagnóstico da outra infecção pulmonar:

57. Diagnóstico prévio de alguma infecção ocular?

0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;

58. Qual patógeno da infecção ocular?

0. () Toxoplasmose; 1. () Sífilis; 2. () Uveíte reumática; 3. () Herpes simplex; 4. () Herpes zoster; 5. () Sarcoidose; 6. () outros.

59. Data do diagnóstico da infecção ocular:

60. Tabagismo:

0. () não; 1. () sim;

61. Maços/Ano:

62. Alcoolismo (CAGE):

0. () não; 1. () sim;

63. Diabetes Mellitus:

0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;

64. Uso de imunossupressores:

0. () não; 1. () sim;

65. Qual imunossupressor:

66. Uso de algum medicamento, qual?

67. História Familiar de TB?

0. () Pais; 1. () Filhos; 2. () Irmãos; 3. () Avós; 4. () Outro; 5. () não;

68. Tosse: dias. 0. () não.

69. Espectoração: dias. 0. () não.

70. Hemoptise: dias. 0. () não.

71. Dispneia: dias. 0. () não.

72. Dor Torácica: dias. 0. () não.

73. Cianose: dias. 0. () não.

74. Chieira: dias. 0. () não.

75. Febre: dias. 0. () não.

76. Adinamia: dias. 0. () não.

77. Anorexia: dias. 0. () não.

78. Sudorese noturna: dias. 0. () não.

79. Tremores: dias. 0. () não.

80. Emagrecimento: dias. 0. () não.

81. Mialgia: dias. 0. () não.

82. Diarréia: dias. 0. () não.

83. Dor Abdominal: dias. 0. () não.

84. Prurido cutâneo: dias. 0. () não.

85. Baixa da acuidade visual: dias. 0. () não.

86. Dor Ocular: dias. 0. () não.

87. Hiperemia Ocular: dias. 0. () não.

88. Moscas volantes: dias. 0. () não.

89. Tonometria:

90. Data da tonometria:

91. Ectoscopia:

92. Data da ectoscopia:
 93. Biomicroscopia:
 94. Data da biomicroscopia:
 95. Fundoscopia:
 96. Data da fundoscopia:
 97. Angiofluorescência:
 98. Data da Angiofluorescência:
 99. Ecografia:
 100. Data da ecografia:
 101. Eletrofisiologia:
 102. Data da eletrofisiologia:
 103. Outros:
 104. Data dos outros:
 105. Frequência respiratória:
 106. Frequência cardíaca:
 107. P. A. sistólica:
 108. P. A. diastólica:
 109. Temperatura axilar:
 110. Peso: Kg.
 111. IMC:
 112. Caquexia:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 113. Candidíase Oral:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 114. Leucoplasia pilosa:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 115. Linfadenopatia:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 116. Alterações neurológicas:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 117. Função cerebral normal:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 118. Herpes Zoster:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 119. Herpes simplex disseminada (HSV):
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 120. Dermatite pruriginosa disseminada (DPS):
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 121. Outra dermatite:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 122. Sarcoma de Kaposi:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 123. Hepatomegalia:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 124. Esplenomegalia:
 0. () não; 1. () sim; 2. () impossível avaliar;
 125. Cicatriz de BCG em mm: sim maior 3mm.
 98. () não; 99. () impossível avaliar;
 126. Outras alterações do exame físico:
 127. Realizou radiograma de tórax próximo ao diagnóstico:
 0. () não; 1. () sim; 2. () não sabe;
 128. Data do Rx próximo ao diagnóstico:
 129. Alterações da radiografia de tórax:
 0. () normal; 1. () infiltrado LSD; 2. () infiltrado terço médio D; 3. () infiltrado LID; 4. () infiltrado LSE; 5. () infiltrado terço médio E; 6. () infiltrado terço inf. E; 7. () Cavidade (1 ou + > 2 cm); 8. () Ademomegalia; 9. () Derrame pleural; 10. () Fibroatelestasias; 11. () Atelectasias; 12. () Bronquiectasias; 13. () Consolidação; 14. () Outros;
 130. Radiografias anteriores:
 0. () não; 1. () sim;
 131. Alterações da radiografia anterior:
 0. () normal; 1. () infiltrado spd; 2. () infiltrado terço médio D; 3. () infiltrado terço inf. D; 4. () infiltrado terço sup. E; 5. () infiltrado méd E; 6. () infiltrado terço inf. E; 7. () Cavidade (1 ou + > 2 cm); 8. () Ademomegalia; 9. () Derrame pleural; 10. () Fibroatelestasias; 11. () Atelectasias; 12. () Bronquiectasias; 13. () Consolidação; 14. () Outros;
 132. Quantas radiografias posteriores:
 133. Data do 1º Rx posterior:
 134. Data do 2º Rx posterior:
 135. Data do 3º Rx posterior:
 136. 1º PPD:
 0. () não reator; 1. () reator fraco; 2. () reator forte;
 137. Medida do 1º PPD em mm: mm.
 138. Data do 1º PPD:
 139. Medida do 2º PPD booster em mm: mm.
 140. Data do PPD com booster:
 141. Medida do 3º PPD em mm: mm.
 142. Data do 3º PPD:
 143. Elisa HIV:
 0. () negativo; 1. () positivo; 2. () inconclusivo; 3. () não realizado;

144. Data do Elisa HIV:
 145. Western-Blot HIV:
 0. () negativo; 1. () positivo; 2. () inconclusivo; 3. () não realizado;
146. Data do Western-Blot HIV:
 147. Contagem de CD4+:
 148. Data do CD4+:
 149. Contagem de CD8+:
 150. Data do CD8+:
 151. Relação CD4+/CD8+:
 152. Data da relação CD4+/CD8+:
 153. Carga Viral:
 154. Log da Carga Viral:
 155. Data da Carga Viral:
 156. IgG Toxoplasmose:
 0. () negativo; 1. () positivo;
157. IgM Toxoplasmose:
 0. () negativo; 1. () positivo;
158. Data da sorologia para Toxoplasmose:
 159. Sífilis:
 0. () negativo; 1. () positivo;
160. Data da sorologia para sífilis:
 161. Sorologia para o vírus da Hepatite B:
 0. () negativo; 1. () positivo;
162. Data da sorologia para o vírus da Hepatite B:
 163. Sorologia para o vírus da Hepatite C:
 0. () negativo; 1. () positivo;
164. Data da sorologia para o vírus da Hepatite C:
 165. Hemograma:
 0. () Alterado; 1. () Normal;
166. Qual a alteração do hemograma:
 0. () anemia; 1. () Leucopenia; 2. () Leucocitose; 3. () Eosinofilia
167. Data do Hemograma:
 168. TGO (ASAT) > 3x o valor normal:
 0. () negativo; 1. () positivo;
169. TGP (ALAT) > 3x o valor normal:
 0. () negativo; 1. () positivo;
170. Data das transaminases:
 171. Bilirrubina total > 3x valor normal:
 0. () negativo; 1. () positivo;
172. Bilirrubina direta > 3x valor normal:
 0. () negativo; 1. () positivo;
173. Bilirrubina indireta > 3x valor normal:
 0. () negativo; 1. () positivo;
174. Data das bilirrubinas:
 175. Uréia:
 0. () não alterada; 1. () alterada;
176. Data da uréia:
 177. Creatinina:
 0. () não alterada; 1. () alterada;
178. Data da creatinina:
 179. Glicemia:
 0. () não alterada; 1. () alterada;
180. Data glicemia:
 181. Contagem de Plaquetas:
 182. Data da contagem de plaquetas:
 183. Tomografia Computadorizada de Tórax (TC Tórax):
 0. () imagem em vidro fosco; 1. () árvore em brotamento; 2. () fibrose; 3. () nódulos; 4. () massas; 5. () bronquiectasias; 6. () outros.
184. Data da TC inicial:
 185. TC de alta:
 0. () imagem em vidro fosco; 1. () árvore em brotamento; 2. () fibrose; 3. () nódulos; 4. () massas; 5. () bronquiectasias; 6. () Fibroatelectasias; 7. () outros.
186. Data da TC de alta:
 187. Realização de broncoscopia:
 0. () não; 1. () sim;
188. Descrição da broncoscopia:
 189. Data da broncoscopia:
 190. Análise Histopatológica de qual material:
 0. () pleura; 1. () brônquio; 2. () pulmão; 3. () pele; 4. () fígado; 5. () medula óssea; 6. () intestino; 7. () ocular; 8. () osso;
191. Data da análise histopatológica:
 192. Resultado da análise histopatológica:
 0. () compatível com TB; 1. () compatível com TB BAAR positivo; 2. () compatível com Sarcoidose; 3. () compatível com G W; 4. () neoplasia; 5. outros.
193. Data do resultado da análise histopatológica:

194. Escarro induzido ZN:
0. () negativo; 1. () +; 2. () ++; 3. () +++;
195. Data do escarro induzido:
196. Aspirado brônquico:
0. () negativo; 1. () positivo;
197. Data do aspirado brônquico:
198. LBA (Lavado Bronco-Alveolar):
0. () negativo; 1. () positivo;
199. Data do LBA:
200. Análise de líquido pleural:
0. () negativo; 1. () positivo;
201. Data da análise do líquido pleural:
202. Análise do líquido sinovial:
0. () negativo; 1. () positivo;
203. Data da análise do líquido sinovial:
204. Análise do aspirado medula óssea:
0. () negativo; 1. () positivo;
205. Data da análise do aspirado medula óssea:
206. Análise de secreção linfonodal:
0. () negativo; 1. () positivo;
207. Data da análise da secreção linfonodal:
208. Análise de líquido peritoneal:
0. () negativo; 1. () positivo;
209. Data da análise do líquido peritoneal:
210. Análise de tecido hepático:
0. () negativo; 1. () positivo;
211. Data da análise de tecido hepático:
212. Análise de escarro ZH:
0. () negativo; 1. () +; 2. () ++; 3. () +++;
213. Data da análise do escarro:
214. Análise de escarro induzido: Auramina
0. () negativo; 1. () +; 2. () ++; 3. () +++;
215. Data da análise do escarro induzido:
216. Análise de aspirado brônquico: Auramina
0. () negativo; 1. () positivo;
217. Data da análise do aspirado brônquico:
218. Análise de lavado bronco alveolar (LBA) com auramina:
0. () negativo; 1. () positivo;
219. Data análise de lavado bronco alveolar (LBA) com auramina:
220. Análise de líquido pleural com auramina:
0. () negativo; 1. () positivo;
221. Data da análise do líquido pleural com auramina:
222. Análise de líquido sinovial com auramina:
0. () negativo; 1. () positivo;
223. Data da análise do líquido sinovial com auramina:
224. Análise de aspirado de medula óssea com auramina:
0. () negativo; 1. () positivo;
225. Data da análise do aspirado de medula óssea com auramina:
226. Análise de secreção linfonodal com auramina:
0. () negativo; 1. () positivo;
227. Data da análise da secreção linfonodal com auramina:
228. Análise de líquido peritoneal com auramina:
0. () negativo; 1. () positivo;
229. Data da análise de líquido peritoneal com auramina:
230. Análise de tecido hepático com auramina:
0. () negativo; 1. () positivo;
231. Data da análise de tecido hepático com auramina:
232. Análise de escarro com auramina:
0. () negativo; 1. () +; 2. () ++; 3. () +++;
233. Data da análise do escarro com auramina:
234. Resultado de cultura:
0. () negativo; 1. () positivo;
235. Data da realização da cultura:
236. Natureza do material para cultura:
0. () escarro; 1. () LBA; 2. () aspirado brônquico; 3. () urina; 4. () medula óssea; 5. () sangue; 6. () LCR;
7. () secreção linfonodal; 8. () pele; 9. () pleura; 10. () pulmão; 11. () intestino; 12. () linfonodo; 13. () escarro
induzido; 14. () líquido pleural; 15. () líquido peritoneal; 16. () líquido sinovial; 17. () frangimento de peritônio; 18. ()
osso; 19. () fígado;
237. Data da coleta do material para cultura:
238. Tipo de TB:
0. () pulmonar; 1. () pleural; 2. () renal; 3. () linfonodal; 4. () ocular; 5. () disseminada; 6. () miliar; 7. ()
meníngea; 8. () articular; 9. () óssea; 10. () pele; 11. () laríngea; 12. () hepática; 13. () intestinal;
239. TI:
0. () Mtb; 1. () Msp; 2. () Mavium; 3. () Mkansassii; 4. () Mfortuitum; 5. () Mchelonae;
240. Data TI:

241. TS:
0. () sensível; 1. () H; 2. () R; 3. () Z; 4. () E; 5. () Et; 6. () S; 7. () O;
242. Data TS:
243. MIC: 244. Data do MIC:
245. PFP:
0. () DOL; 1. () DOM; 2. () DOA; 3. () DRL; 4. () DRM; 5. () DRA; 6. () DML; 7. () DMM; 8. () DMA;
246. Data PFP:
247. Dessaturação ao realizar o teste de caminhada:
0. () não; 1. () sim;
248. Data da realização do teste da caminhada:
249. Teste de difusão de CO:
0. () normal; 1. () alterado;
250. Data do teste de difusão de CO:
251. Asmático:
0. () não; 1. () sim;
252. Portador de DPOC:
0. () não; 1. () sim;
253. Uso de broncodilatador:
0. () não; 1. () sim;
254. Uso de corticoide inalatório:
0. () não; 1. () sim;
255. Realização de fisioterapia respiratória:
0. () não; 1. () sim;
256. Realização de quimioprofilaxia:
0. () não; 1. () sim;
257. Faz uso de B6:
0. () não; 1. () sim; 258. Data do início de B6: 259. Data de término de B6:
260. Faz uso de Rifampicina:
0. () não; 1. () sim;
261. Data do início da Rifampicina:
262. Data do término da Rifampicina:
263. Faz uso de Isoniazida:
0. () não; 1. () sim;
264. Data do início da isoniazida:
265. Data do término da isoniazida:
266. Faz uso de Pirazinamida:
0. () não; 1. () sim;
267. Data do início da Pirazinamida:
268. Data do término da Pirazinamida:
269. Faz uso de Etambutol:
0. () não; 1. () sim;
270. Data do início do Etambutol:
0. () não; 1. () sim;
271. Data do término do Etambutol:
272. Faz uso de Etionamida:
0. () não; 1. () sim;
273. Data do início da Etionamida:
274. Data do término da Etionamida:
275. Faz uso de Estreptomicina:
0. () não; 1. () sim;
276. Data do início da Estreptomicina:
277. Data do término da Estreptomicina:
278. Faz uso de Ofloxacina:
0. () não; 1. () sim;
279. Data do início da Ofloxacina:
280. Data do término da Ofloxacina:
281. Faz uso de inibidor da bomba de H:
0. () não; 1. () sim;
282. Data do início do inibidor da bomba de H:
283. Data do término do inibidor da bomba de H:
284. Faz uso de outros medicamentos: Quais.
285. Data do início dos outros medicamentos:
286. Data do término dos outros medicamentos:
287. Apresentou algum efeito adverso com o uso da medicação:
0. () náuseas; 1. () vômitos; 2. () anorexia; 3. () dor abdominal; 4. () artralgia e artrite; 5. () neurite periférica; 6. () insônia; 7. () euforia; 8. () ansiedade; 9. () cefaléia; 10. () secreção avermelhada; 11. () prurido; 12. () eczantema; 13. () hipoacusia; 14. () vertigem; 15. () nistagmo; 16. () crise convulsiva; 17. () encefalopatia; 18. () confusão mental; 19. () icterícia; 20. () neurite ótica; 21. () choque; 22. () púrpura; 23. () lupus like; 24. () nefrite; 25. () rabdomiólise; 26. () parestesia oral;
288. Realizou mudança na medicação:
0. () não; 1. () sim;
289. De qual medicamento:
0. () Isoniazida; 1. () Rifampicina; 2. () Estreptomicina; 3. () Etambutol; 4. () PZA; 5. () Rifabutina; 6. () Amicacina; 7. () Cipro/Ofloxacina; 8. () Clofazima; 9. () Terizidona;
290. Para qual medicamento:

0. () Isoniazida; 1. () Rifampicina; 2. () Estreptomicina; 3. () Etambutol; 4. () PZA; 5. () Rifabutina; 6. () Amicacina; 7. () Cipro/Ofloxacina; 8. () Clofazima; 9. () Terizidona;

291. Data da mudança:

292. Com quanto tempo voltará para o controle:

0. () seis meses; 1. () dois anos; 2. () cinco anos;

293. Resultado do controle:

0. () alta; 1. () óbito; 2. () recidiva; 3. () falência; 4. () transferido; 5. () MDR; 6. () abandono; 7. () retorno;

294. Entrevistador.