

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Comparação do desempenho de meios de cultura Lowenstein-Jensen produzidos com diferentes tipos de ovos para realização do teste de sensibilidade aos fármacos no tratamento da tuberculose.

Ludmila Oliveira Lamounier

Belo Horizonte

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Ludmila Oliveira Lamounier

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título Especialista

Aluna: Ludmila Oliveira Lamounier

Orientador: Cláudio José Augusto

Belo Horizonte

2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Cláudio José Augusto, não só pela orientação durante a elaboração do trabalho, mas também pela disponibilidade durante a execução dos testes, pela confiança, pela parceria e por compartilhar todo o conhecimento a respeito do tema abordado.

A todos os meus amigos e companheiros de trabalho do Serviço de Produção da DHPMC, em especial Neli, Nádia, Fabiane, Carla, Raquel e Michelle pela parceria e amizade durante a produção dos lotes de LJ para análise.

Aos amigos do Serviço de Controle de Qualidade, Tiago, Beatriz, Ana Paula e Bárbara pelo apoio, amizade, compreensão e ajuda não só neste trabalho, mas em todas as atividades que executadas na Funed. Em especial a Cristiane Chagas pela amizade, apoio e paciência ao realizar as correções e durante a edição do trabalho, sempre com ótimas sugestões.

Aos amigos do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas, pelo apoio durante a execução dos testes de sensibilidade, em especial a Élide Aparecida Leal, que estava sempre disponível, durante a realização das leituras e em qualquer outro momento em que precisasse esclarecer minhas dúvidas.

A Dra. Jovita Gazzinelli, pelo apoio no Projeto de Novos Produtos na Funed, e incentivo para realização dos testes. Além da parceria, amizade e conselhos divididos durante todo este ano.

A minha família e ao meu namorado por sempre incentivarem os estudos e pelo apoio para tudo que me proponho a fazer. Em especial a minha irmã Ana Gabriela, pela ajuda na formatação e correção final.

RESUMO

A Tuberculose é uma doença infecciosa, transmitida de pessoa para pessoa, considerada um grave problema de saúde pública mundial. É causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, acometendo principalmente os pulmões. O diagnóstico definitivo de TB se dá pela identificação das micobactérias presentes em uma amostra biológica, pelo exame de cultura, considerado padrão-ouro, pois proporciona alta sensibilidade e especificidade para a detecção de TB pulmonar e extrapulmonar. É padronizado utilizar na formulação dos meios de cultura, ovos provenientes de galinha que não receberam antibiótico na alimentação, com postura de no máximo sete dias, e comprovação por certificação e rastreabilidade dos lotes. Atualmente é utilizado na Funed o ovo não embrionado destinado à pesquisa, no entanto existem outros tipos de ovos, como o orgânico e o caipira que também atendem aos requisitos exigidos. O objetivo deste trabalho foi comparar o desempenho do meio de cultura sólido *Lowenstein-Jensen*, utilizando em sua formulação três diferentes tipos de ovos: o ovo caipira, ovo não embrionado destinado à pesquisa e ovo orgânico. Foram realizados testes comparativos de desempenho do meio com estes ovos, garantindo assim que a troca não influenciaria no desempenho do meio de cultura. Sendo realizado análise de desempenho controle visual, esterilidade, pH e Teste de Sensibilidade pelo Método das Proporções Indireto aos fármacos Estreptomina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol com inoculação de cepas com perfis de sensibilidade e resistência já conhecidos e padronizados. Após análise de todos os testes realizados, foi verificado que os três lotes apresentaram resultados satisfatórios na análise de controle visual, faixa de pH, teste de esterilidade, e teste de sensibilidade, em relação aos critérios estabelecidos, além de demonstrarem desempenho idêntico no Teste de Sensibilidade, no entanto a facilidade da garantia de certificação rastreabilidade é maior para o ovo orgânico em comparação ao ovo caipira. Sendo assim, é possível concluir, que o meio de cultura LJ produzido com o ovo orgânico, atende a todos os critérios de qualidade exigidos, rastreabilidade de todo o lote, além de tornar viável a comercialização, pois diminui o custo com o ovo para produção em 95%, já que o custo anual passaria em média de R\$102.000,00 para R\$5.000,00.

Palavras-chave: Tuberculose; Ovo; Lowenstein-Jensen e Teste de Sensibilidade.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease transmitted from person to person, considered a serious public health problem worldwide. It is caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*, affecting mainly the lungs. The definite diagnostics of TB is made by identification of Mycobacteria present in a biological sample, by the culture exam, considered the gold-standard, because provides high sensibility and specificity for detection of pulmonary and extrapulmonary TB. It is standardized to use in the formulation of the culture medium, eggs from chicken that did not receive antibiotics in the feed, with a posture of no more than seven days, and evidence by certification and traceability of the batches. Currently is used in Funed, for research, the non-embryonated egg, however there are other types of eggs, such as organic and rustic which are also submitted to the required requirements. The objective of this work was compare the performance of the Lowenstein-Jensen solid culture medium, using in its formulation three different types of eggs: the rustic egg, the non-embryonated egg, intended for research, and the organic egg. Comparatives tests of the medium performance were carried out with these eggs, ensuring, in this way, that an exchange would not influence in the performance of the culture medium. Being carried out performance analysis of visual control, sterility, pH and Sensibility test by the method of Indirect Proportions to the drugs Streptomycin, Isoniazid, Rifampin and Ethambutol with inoculation of strains with known and standardized sensibility and resistance profiles. After the analysis of all the carried out tests, was verified that the three batches presented satisfactory results in the analysis of visual control, pH range, sterility test, and sensibility test, in relation to the established criteria, besides showing identical performance in the Test of Sensibility, however the ease of warranty of certification and traceability is greater for the organic egg compared to the rustic egg. Thus, it is possible to conclude that the LJ culture medium produced with the organic egg it is submitted to the quality criteria required, traceability of the entire batch, besides making the commercialization viable because it decreases the cost with the egg for production in 95%, since the annual cost could pass average R\$ 102.000,00 .00 to R\$ 5.000,00.

Key-words: Tuberculosis; Egg; Lowenstein-Jensen and sensibility test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Homogeneização após etapa de hidratação.	22
Figura 2: Etapa de esterilização da base do meio de cultura Lowenstein-Jensen. ...	23
Figura 3: Preparação da emulsão de ovos.....	24
Figura 4: Etapa de coagulação do meio de cultura Lowenstein-Jensen.	25
Figura 5: Kit de Lowenstein-Jensen pronto	26
Figura 6: Crescimento de micobactéria linhagem 853 no lote de LJ produzido com ovo orgânico.....	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Fármacos utilizadas na produção dos kits de Lowenstein-Jensen.....	21
Quadro 2: Concentração crítica dos fármacos e proporção utilizada como critério de classificação de resistência	30
Quadro 3: Concentração dos fármacos utilizados.....	Erro! Indicador não definido.
Quadro 4: Resultado de valores de pH das amostras de cada lote de Lowenstein-Jensen.....	30
Quadro 5: Perfil de crescimento das cinco linhagens utilizadas nos testes de sensibilidade.....	34
Quadro 6: Resultado do Teste de Sensibilidade após 28 dias de incubação dos lotes de Lowenstein-Jensen com inóculo de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	36
Quadro 7: Resultado do Teste de Sensibilidade após 42 dias de incubação dos lotes de Lowenstein-Jensen com inóculo de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
DIOM	Diretoria do Instituto Octávio Magalhães
DHPMC	Divisão de Higienização e Produção de Meios de Cultura
Funed	Fundação Ezequiel Dias
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
LACEN	Laboratório Central
LJ	Lowenstein-Jensen
MG	Minas Gerais
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MNT	Micobactérias Não- Tuberculosas
OK	Ogawa-Kudoh
OMS	Organização Mundial de Saúde
SDBF	Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas
TB	Tuberculose
TS	Teste de Sensibilidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Aspectos Históricos da Tuberculose.....	12
2.2 Micobactérias	13
2.3 Transmissão	14
2.4 Diagnóstico.....	14
2.4.1 Baciloscopia.....	15
2.4.2 Cultura para micobactéria, identificação e teste de sensibilidade.....	15
2.5 Tratamento.....	16
3. OBJETIVO.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4. METODOLOGIA.....	19
4.1 Processo de Produção.....	22
4.2 Preparação dos Kits para análise de desempenho.....	25
4.3 Controle de Qualidade.....	27
4.4 Teste de Sensibilidade.....	27
4.4.1 Teste de Sensibilidade pelo Método das Proporções Indireto Utilizando LJ.....	27
4.5.2 Método automatizado utilizando meio líquido.....	30

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
6 CONCLUSÕES.....	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose – (TB) é uma doença infecciosa, transmitida de pessoa para pessoa, considerada um grave problema de saúde pública mundial. É causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, acometendo principalmente os pulmões, podendo afetar outras partes do organismo (WHO, 2016).

Pessoas que foram infectadas com o bacilo da tuberculose apresentam uma chance de 10% de desenvolver a doença, no entanto pessoas imunodeprimidas como, por exemplo, as portadoras do *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), com diabetes, desnutridas e fumantes, apresentam um risco muito maior de evolução da enfermidade (WHO, 2016).

A Tuberculose é uma das 10 principais causas de mortalidade do mundo. Segundo dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) 10,4 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose em 2015 e 1,8 milhões foram a óbito devido a esta doença, sendo que destas 0,4 milhões eram HIV positivas. Estima-se que no ano de 2015, cerca de 48.000 pessoas desenvolveram tuberculose multirresistente. No entanto, foi registrado que entre 2000 e 2015 foram curadas em torno de 49 milhões de pessoas, isso se deve principalmente a um serviço melhor de diagnóstico e tratamento correto (WHO, 2016).

No Brasil foram notificados em 2015 cerca de 81.000 casos de tuberculose e uma cobertura de tratamento estimada em 87% (WHO, 2016). De acordo com dados epidemiológicos parciais divulgados pela Secretaria Estadual de Saúde (2016), no ano de 2015, o Estado de Minas Gerais notificou cerca de 4.039 doentes, e 212 óbitos, sendo que um terço de todos os casos do estado estão concentrados na região metropolitana de Belo Horizonte. Dados preocupantes mostram uma alta taxa de abandono do tratamento em 2014, aproximadamente 10,6%. Sendo, portanto, um dos grandes desafios para o controle da tuberculose (SES, 2016).

O diagnóstico definitivo de (TB) se dá pela identificação das micobactérias presentes em uma amostra biológica através da baciloscopia, da cultura ou de métodos

moleculares. O exame de cultura é de grande importância, já que permite o isolamento dos bacilos ácido-álcool resistentes – (BAAR) de amostras clínicas em meio específicos. É considerado o exame padrão-ouro, pois proporciona alta sensibilidade e especificidade para a detecção de TB pulmonar e extrapulmonar. É de grande importância também à realização do teste de sensibilidade da micobactéria isolada na cultura, diante de fármacos de esquemas terapêuticos médicos padronizados pelo Ministério da Saúde para tratamento da tuberculose. Para tanto, na grande maioria dos Laboratórios Centrais - LACEN's do Brasil é padronizado a utilização do meio de cultura Lowenstein-Jensen (LJ), sem e com adição de fármacos utilizados no tratamento da TB. (BRASIL, 2008)

A Fundação Ezequiel Dias – (FUNED) é um órgão do sistema estadual de saúde e foi fundada em 03 de agosto de 1907, tem por objetivo promover a saúde pública através da realização de pesquisas de desenvolvimento científico e tecnológico no campo da saúde bem como na realização de análises laboratoriais voltadas para a saúde coletiva. A Diretoria do Instituto Octávio Magalhães (DIOM) tem por obrigação como LACEN-MG, planejar, dirigir, executar e avaliar as atividades epidemiológicas entre outras, participando dos processos de investigação, diagnóstico e realizando a notificação de doenças compulsória; entre estas a tuberculose.

A Divisão de Higienização e Produção de Meio de Cultura – (DHPMC), localizada nas dependências da FUNED, tem como uma de suas várias funções, fornecer meios de cultura para as Divisões de Vigilância Sanitária, Epidemiológica, Controle de doenças e demais laboratórios da instituição. Entre esses meios de cultura, é produzido o LJ, que por sua vez é entregue ao Serviço de Doenças Bacteriológicas e Fúngicas (SDBF) e o meio de cultura Ogawa-Kudoh (OK), que é fornecido às regionais de MG, para inoculação das amostras na realização de cultivo para micobactérias.

Anualmente são produzidos na DHPMC, cerca 24.000 tubos de meios de cultura utilizados no diagnóstico de TB, o que corresponde a um gasto médio de R\$101.500,00 apenas com o ovo utilizado na formulação deste meio.

A produção destes meios de cultura tem se tornado cada vez mais caras por ser padronizada a utilização de ovos provenientes de galinha que não receberam antibiótico na alimentação, com postura de no máximo sete dias, sendo necessária comprovação por certificação e rastreabilidade dos lotes (BRASIL, 2011).

Atualmente a DHPMC utiliza ovo não embrionado destinado à pesquisa, no entanto, existem no mercado outros tipos de ovos com custo muito inferior, cerca de dezoito vezes, que segundo classificação de seus produtores, também apresentam características que atendem aos requisitos exigidos para a produção dos meios de cultura utilizados no diagnóstico de tuberculose. Podemos citar o ovo orgânico e o ovo caipira. Por tanto objetivo deste trabalho foi, realizar testes comparativos de desempenho do meio com estes diferentes ovos em sua formulação, garantindo assim que a troca do ovo não influenciará na eficiência e sensibilidade do meio de cultura e proporcionando uma redução dos custos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Históricos da Tuberculose

A tuberculose é uma enfermidade de origem milenar, tendo como principal agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*.

Apesar de ter sido descrita pela primeira vez na Índia, a tuberculose pulmonar é relatada desde o tempo de Hipócrates como tísico, que em grego significa definhar (DUCATI, 2006). Nos séculos XIV e XV, os médicos começaram a demonstrar a possibilidade de contágio entre pessoas, entretanto, soube-se muito pouco da doença até o século XVI (DANIEL, 2006). A partir dos séculos XVII e XVIII, a tuberculose passa a ser mais bem compreendida e recebe seu nome atual (ROBESTS; BUIKSTRA, 2005). A tuberculose foi a principal causa de morte até o final do século XIX e início do século XX (DUCATI, 2006). A melhoria da qualidade de vida em alguns países, no século XX, a iniciação do tratamento com antibióticos na década de quarenta e em paralelo a inserção de políticas de saúde para o controle, foram determinantes para a queda na mortalidade pela doença (CARVALHO, 2011).

Acredita-se que a tuberculose foi introduzida no Brasil por missionários jesuítas e portugueses, desde a chegada destes em 1500 (DUCATI, 2006). A epidemia de TB no Brasil tornou-se realidade em grande parte das cidades, sendo conhecida como “a praga dos pobres”, devido à relação estabelecida com ausência de higiene adequada, alimentação deficiente e moradias insalubres, condições observadas nas populações mais acometidas (SHEPPARD, 2001).

Foram implantadas importantes políticas Nacionais no controle da Tuberculose no Brasil, como a Inspetoria de Profilaxia da Tuberculose (1920), vacina BCG, iniciada em 1927, o Serviço Nacional de Tuberculose (1940), e a Campanha Nacional Contra a Tuberculose (1946).

Foi criado em 1999, o Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), com o objetivo de ampliar as ações de controle em todo o território nacional, em 2001 as ações do PNCT, tornaram-se competência da atenção básica, sendo que em 2006 foi incluída como estratégia do Plano Nacional de Atenção Básica, sendo definidos indicadores que devem ser monitorados e avaliados (SCATENA, 2009).

Foi aprovado em 2014 na Assembléia Mundial de Saúde, a Estratégia pelo fim da Tuberculose, que tem como objetivo o “fim da epidemia global da tuberculose”, para tanto foram definidas metas para alcançar este objetivo até o ano de 2035, tais como: reduzir o número de óbitos pela tuberculose em até 95%, e reduzir o coeficiente de incidência para menos de 10 casos por 100 mil habitantes. Para o alcance destas metas é importante a participação efetiva dos profissionais de saúde, gestores e sociedade civil (MS, 2014).

2.2 Micobactérias

As micobactérias pertencem à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e se reúnem em um único gênero denominado Mycobacterium. Este gênero é composto até o momento por 127 espécies e 11 subespécies. É constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis*; *M. leprae* entre outras denominadas micobactérias não causadoras da tuberculose (MNT) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

O complexo *M. tuberculosis* é composto pelas espécies *M. bovis*, que causa doença em bovinos, *M. microti* patogênica para roedores, *M. tuberculosis* principal agente da tuberculose humana, no homem e em vários outros mamíferos. Além destes também é conhecido o *M. africanum*, agente etiológico da TB humana que ocorre em maior frequência na África (DUCATI, 2006).

Mycobacterium tuberculosis é um bacilo não flagelado, não formador de esporos e não produtor de toxinas (DUCATI, 2006). É aeróbio restrito e álcool-ácido resistente, característica importante durante o diagnóstico. Este microrganismo é de crescimento lento, com período de geração de 16-20 horas que varia de acordo com pH, nutrientes e oxigênio disponível (Brasil, 2004).

2.3 Transmissão

A tuberculose é uma doença transmitida de pessoa para pessoa. A principal forma de transmissão ocorre através de partículas infectantes. As partículas liberadas por um paciente doente são exaladas dos pulmões infectados para o ar, podendo permanecer em suspensão durante horas, fazendo com que esta seja uma altamente contagiosa (DUCATI, 2006).

A transmissão é facilitada em ambientes com grande aglomeração humana, pouco arejada e que permitam maior tempo de contato com paciente bacilífero (BRASIL, 2011).

A doença apresenta evolução crônica e sua forma clínica é caracterizada, principalmente, pelo comprometimento dos pulmões, podendo atingir outros órgãos ou ocorrer de forma disseminada. A TB pulmonar é a mais frequente e mais importante para a saúde pública, pois é a forma que produz as partículas infectantes responsáveis pela transmissão da doença (BRASIL, 2011).

A coinfeção TB/HIV é significativa e de grande impacto, pois é responsável pelo aumento da incidência, da prevalência e da mortalidade por TB, principalmente no continente africano, onde ocorre um terço dos casos de TB. Na coinfeção TB/HIV ocorre um aumento da viremia plasmática, acentuando uma imunossupressão, aumentando o risco de desenvolver a tuberculose, principalmente em estágios mais elevados. A OMS classificou a TB como uma condição definidora de AIDS nos infectados pelo HIV (BRASIL, 2011).

2.4 Diagnóstico

Realizar o diagnóstico de um paciente tuberculoso, principalmente um bacilífero (paciente que pode liberar bacilos no ambiente), tratá-lo de maneira adequada e curá-lo é uma forma de eliminar uma fonte de infecção, assim quebrando uma cadeia de transmissão (DE LOUREIRO MAIOR, 2012).

Por ser uma doença infectocontagiosa, apresenta um quadro clínico na maioria das vezes composto por presença de febre baixa, geralmente vespertina, indisposição, sudorese noturna, perda de peso e insuficiência respiratória (DUCATI, 2006).

O diagnóstico é composto por exames radiológicos, bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos. Iremos destacar neste trabalho a cultura de micobactérias, que pode ser realizada na rotina dos laboratórios, e será objeto do nosso estudo (GUERRA, 2008).

2.4.1 Baciloscopia

É um método simples de ser executado, rápido e seguro, sendo assim, deve ser realizado por todo laboratório público de saúde e pelos laboratórios privados que forem tecnicamente habilitados (FERREIRA, 2005). A técnica mais utilizada para a pesquisa do BAAR é feita pelo método de coloração de Ziehl-Neelsen, esta permite visualizar micobactérias mais facilmente em comparação a métodos de coloração tradicionais. É um método de baixa sensibilidade, mas que se executado de forma correta, a baciloscopia do escarro, permite detectar de 60% a 80% dos casos de tuberculose pulmonar (GUERRA, 2008).

A forma preconizada para um procedimento correto é a coleta do escarro em duas amostras, sendo a primeira no momento em que o paciente procurar o serviço médico e a segunda no dia seguinte, logo após o paciente acordar, pois esta segunda amostra é composta da secreção acumulada na árvore brônquica durante toda a noite, por isso em geral apresenta um maior número de bacilos, o que aumenta as chances da detecção dos bacilos (BRASIL, 2008).

2.4.2 Cultura para micobactéria, identificação e teste de sensibilidade

A cultura é o método de referência, considerado padrão ouro no diagnóstico da tuberculose, pois apresenta sensibilidade de 70 a 90% e especificidade de 90% (BICA, 2003).

No método clássico realiza-se semeadura da amostra em meios de cultura sólidos. Os mais utilizados são os meios feitos à base de ovo, como o Lowenstein-Jensen (LJ) e o Ogawa-Kudoh (ANVISA, 2013).

Estes meios além da alta taxa de sensibilidade e especificidade apresentam também a vantagem de ter um custo e um índice de contaminação menor. Este método permite uma leitura quantitativa, porém o tempo de detecção do crescimento bacteriano que varia de duas a três semanas. (BENTO, 2011).

Para realização do teste de sensibilidade os laboratórios do país utilizam o método das proporções em meio sólido LJ com adição de antimicrobianos, que obtém seu resultado após 42 dias de incubação. Também são realizados os métodos que utilizam o meio líquido, que conseguem resultado após 5 a 13 dias. Os fármacos testados, em geral, são Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida (BRASIL, 2011).

Os meios à base de ágar também podem ser utilizados, no entanto são de difícil preparo e apresentam um custo maior. Podemos citar como exemplo o Middlebrook 7H10 e o 7H11 (CAMPOS, 2006).

Existem também os meios líquidos como o Herman Kirchner, 7H9 E 7H12 de Middlebrook. São meios mais enriquecidos que os sólidos, sendo assim são indicados para análises de amostras paucibacilares, como sangue, LCR e macerados de tecidos. Estes meios são utilizados no esquema de isolamento primário de micobactérias e também no subcultivo e armazenamento de linhagens em freezer (BRASIL, 2008).

Acompanhando o avanço tecnológico, vários métodos automatizados foram desenvolvidos, como o BATEC 460 System, o Middlebrook 7H9 e o BATEC 960 – MGIT (BRASIL, 2008).

O sistema MGIT permite a detecção do consumo de oxigênio pelas micobactérias pela detecção de emissão de fluorescência emitida pelo rutênio, que também está presente nos tubos de ensaio contendo meio líquido (BRASIL, 2008).

2.5 Tratamento

A tuberculose atualmente é uma doença tratável com possibilidade de cura. (SEISCENTO, 1997). Para tanto, se faz necessário seguir os princípios básicos da terapia medicamentosa (associação medicamentosa adequada, doses corretas e uso por tempo suficiente) e a adequada operacionalização do tratamento. Além destes princípios, é essencial a realização do Tratamento Diretamente Observado (TDO) da tuberculose, que consiste na ingestão diária dos medicamentos da tuberculose pelo paciente sob a observação de um profissional da equipe, visando o

aumento da adesão ao tratamento e as taxas de cura (FRIEDEN, 2007).

O tratamento da TB se dá principalmente pelo esquema básico que utiliza a Rifampicina, Isoniazida, Etambutol e Pirazinamida por um período mínimo de seis meses (BRASIL, 2008).

Para os casos novos que iniciam o tratamento é precomizado a administração por dois meses dos fármacos Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida, e Etambutol por um período mínimo de seis meses (BRASIL, 2008).

Em casos de reações adversas aos fármacos ou identificação de resistência, são então administrados fármacos de segunda linha como Fluoroquinolonas, Amicacina e Etionamida entre outros, e o tempo de tratamento é prolongado para até 24 meses dependendo do critério médico e protocolos do PNCT (BRASIL, 2008).

O fracasso no tratamento pode estar relacionado a inúmeros fatores como a irregularidade no uso das drogas, associação incorreta destas, a imunodeficiência e outros fatores que também influenciam na eficiência terapêutica como, diabetes, silicose, gastrectomia, fatores psicoemocionais e socioeconômicos. (SEISCENTO, 1997).

Um tratamento correto e iniciado no período adequado aumenta em grandes proporções as chances de cura, além de diminuir os casos bacilíferos responsáveis pela disseminação da doença, assim favorecendo a saúde pública do país (MENDES, 2004).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Comparar o desempenho do meio de cultura sólido *Lowenstein-Jensen*, utilizando em sua formulação três diferentes tipos de ovos. O ovo caipira, ovo não embrionado destinado à pesquisa e ovo orgânico.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir 5 Kits do meio de cultura Lowenstein-Jensen, com cada tipo de ovo para realização dos testes de desempenho;
- Realizar teste de sensibilidade frente aos fármacos considerados de primeira escolha no tratamento da tuberculose pelo método automatizado (MGIT), com cinco linhagens de diferentes perfis de resistência, de um painel de proficiência nacional;
- Realizar Teste de Sensibilidade pelo Método das Proporções Indireto utilizando os Kits produzidos com os três diferentes tipos de ovos em análise, com inoculação das mesmas cinco linhagens testadas pelo método automatizado;
- Fazer análise comparativa dos resultados obtidos;
- Verificar se o desempenho do meio de cultura LJ sofreu interferência da alteração do tipo de ovo utilizado na formulação.

4 METODOLOGIA

Foi realizada uma comparação do desempenho do meio de cultura LJ (com e sem adição de antimicrobianos), após ser incorporado um tipo de ovo em cada base. Foram testados o ovo caipira, o ovo orgânico e o ovo não embrionado.

O ovo caipira : Preço R\$ 1,32 em média a unidade. Estes ovos são caracterizados pelo menor tamanho em relação aos brancos ou vermelhos de granja, e por apresentarem diversas colorações de casca, exceto a branca. Apresentam gema mais pigmentada, qualidade que se deve ao fato de as galinhas caipiras serem criadas à solta, e, portanto, ingerirem alimentos naturais ricos em carotenoides (DAROLT, 2011). As galinhas são totalmente saudáveis não recebem qualquer tipo de antibiótico. São criadas seguindo os preceitos das 5 liberdades das galinhas (Ser livres de medo e estresse; Ser livres de fome e sede; Ser livres de desconforto; Ser livres de dor e doenças; Ter liberdade para expressar seu comportamento natural), (SOUZA, 1995).

O ovo orgânico: Preço R\$ 1,49 em média a unidade. Para ser considerado orgânico, o ovo deve ser certificado segundo a Instrução Normativa 64 de 18/12/2008 que é a regulamentação brasileira em vigor para esta finalidade. Este certificado é emitido por uma agência certificadora terceirizada, que segue parâmetros ditados pelo Ministério da Agricultura. A produção orgânica animal deve seguir os princípios de bem-estar animal durante todo o processo produtivo, ofertando alimentação nutritiva e saudável em quantidade e qualidade. A água deve ser isenta de agentes químicos e biológicos, e é proibida debicagem (corte de uma parte do bico) das aves, devendo-se garantir também 8 horas por dia no escuro, entre outras.

São consideradas boas práticas da produção de ovos orgânicos:

Ações de preservação da saúde animal, isso inclui o fornecimento de alojamento adequado, condições de pastagens e práticas de saneamento para minimizar a ocorrência e a propagação de doenças e parasitas, oferta de condições que permitam o exercício, a liberdade de circulação e redução do estresse causado pelo acúmulo de animais no mesmo local, necessitando para isto acesso ao ar livre,

sombra, abrigo, áreas de exercício e luz solar direta adequado à espécie, a sua fase de produção, o clima e o meio ambiente.

São proibidos pelos padrões orgânicos, entre outros a utilização de hormônios de crescimento e antimicrobianos, uso da engenharia genética (transgenia) e uso de pesticidas tóxicos e persistentes (BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,2008).

O ovo não embrionado destinado à pesquisa: Preço R\$ 27,00 a unidade. São ovos não férteis, não incubáveis, de cor branca e casca rígida, tamanho grande, pesando pelo menos 55 gramas por unidade, isentos de sujidade, fungos e substâncias tóxicas, com no máximo uma semana de postura, e com no mínimo 04 centímetros de em seu maior diâmetro. As aves não recebem nenhum tratamento à base antibiótico ou qualquer outro antimicrobiano, bem como hormônios de qualquer espécie e promotores de crescimento, sendo submetidas à análise microbiológica semestralmente. É realizado também, controle físico-químico e microbiológico da água fornecida às aves. Os ovos são colhidos, selecionados, classificados e higienizados unitariamente utilizando-se solução específica de higienização, armazenados em temperatura e umidade controladas adequadas a conservação do produto até o momento do uso (CERTIFICADO GRANJA TOLOMEI, 2016).

Para realização do teste, produzido um lote, composto por 5 Kits de LJ, com cada tipo de ovo citado acima. Cada Kit foi composto por 14 tubos, sendo eles, 6 tubos de LJ sem droga, 2 tubos de LJ com Rifampicina, 2 tubos de LJ com Isoniazida, 2 tubos de LJ com Etambutol e dois tubos de LJ com Estreptomicina. Foram utilizados os mesmos equipamentos e todas as etapas foram realizadas pela mesma equipe, o que permite que os resultados de performances divergentes ocorram apenas devido a diferença entre os ovos.

Todos os lotes foram submetidos ao controle visual, teste de esterilidade e promoção de crescimento. Na etapa referente ao controle visual foram verificados parâmetros como, cor, volume, tamanho da base e do bisel, consistência do meio, presença de bolhas, sujidades e precipitado e aspecto da embalagem primária (tampa e tubos íntegros).

O teste de esterilidade foi realizado para garantir que os meios de cultura produzidos não apresentassem contaminação por nenhum microrganismo sendo, portanto, um meio estéril. O teste de promoção de crescimento foi realizado com 5 linhagens diferentes de micobactérias nas diluições 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-6} , conforme Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, 2008.

Os fármacos foram adicionadas ao meio de cultura para verificar se amostra apresenta resistência aos antimicrobianos usados no tratamento da TB. As soluções dos fármacos foram produzidas nas seguintes concentrações. Quadro 1:

Quadro 1: Fármacos utilizados na produção dos kits de Lowenstein Jensen.

Solução mãe (10.000 g/mL)	Diluyente	Concentração da droga na última diluição	Quantidade adicionada em 200 mL de meio	Concentração final de droga no meio (mg/mL)
INH	Água destilada estéril	100	0,4	0,2
RMP	Etilenoglicol ou N,N- dimetilforma mida	10.000	0,8	40
EMB	Água destilada estéril	1.000	0,4	2
SM	Água destilada estéril	10.000	5	500

Legenda: INH: isoniazida; RMP: rifampicina; EMB: etambutol; SM: estreptomicina

Conforme citado anteriormente, foi produzido um lote de cada tipo de ovo, sendo testado, portanto, o ovo caipira, o ovo orgânico e o ovo não embrionado.

4.1 Processo de Produção:

Os lotes para o estudo de comparação foram produzidos em três dias, sendo que no primeiro dia foi produzido um lote de LJ com o ovo não embrionado, no segundo dia um lote de LJ com o ovo caipira e no terceiro dia foi produzido um lote de LJ com o ovo orgânico.

A produção destes lotes de LJ foi programada e realizada de forma que em todos os lotes fossem utilizados os mesmos equipamentos, os mesmos insumos (exceto os ovos), e o processo fosse realizado pela mesma equipe técnica, para garantir que qualquer diferença na qualidade e desempenho do meio seja apenas devido as diferentes propriedades dos ovos utilizados em cada lote, sem interferência de qualquer outro fator.

Todos os lotes foram produzidos segundo o procedimento Produção do Lowenstein Jensen DIOM-UHPMC-MET 0002, como descrito abaixo.

- Primeiramente a base de Lowenstein Jensen foi pesada.
- Posteriormente houve a hidratação do meio de cultura sendo que esta ocorreu lentamente sempre com homogeneização constante (Figura 1).

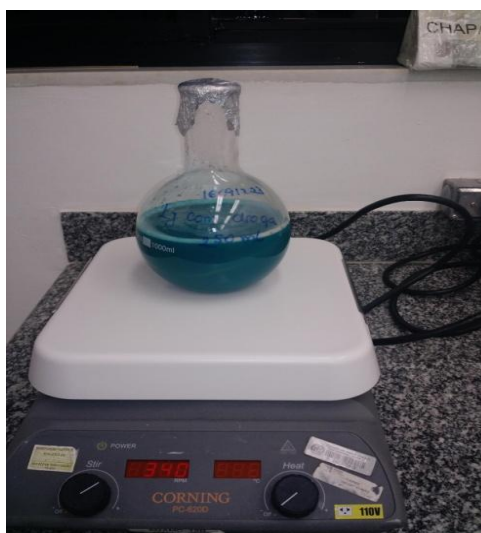


Figura 1: Homogeneização após etapa de hidratação.

Fonte: acervo pessoal

- Em seguida o meio de cultura foi aquecido. Durante este processo o balão foi agitado frequentemente até a dissolução do ágar. Não permitindo que o meio entrasse em fervura.
- Após esta etapa, foi realizada a esterilização, onde o balão contendo o meio de cultura já hidratado e homogeneizado foi inserido na autoclave no ciclo, a temperatura de 121°C durante 15 minutos (Figura 2).



Fonte: acervo pessoal

Figura 2: Etapa de esterilização da base do meio de cultura Lowenstein Jensen.

- Em paralelo foi preparada a emulsão de ovos. Para isso foram selecionados previamente cerca de 25 ovos (sem rachaduras, trincas e de casca íntegra), lavou-se com bucha, água e sabão e em seguida submergidos em álcool desinfetante por 15 minutos. Após este tempo, os ovos foram secos com gaze estéril, e em um fluxo laminar quebrados um a um, separadamente, em um frasco estéril. Em seguida foram transferidos para um saco de *stomacher* e inserido no homogeneizador por aproximadamente 3 minutos (Figura 3).



Figura 3: Preparação da emulsão de ovos

Fonte: acervo pessoal

Antes de se adicionar o homogeneizado de ovos à base de LJ esterilizada, esse foi peneirado e o volume aferido. Os ovos foram adicionados, no fluxo laminar ao balão contendo a base, em seguida mantidos em agitação suave para evitar a formação de bolhas.

- O meio homogeneizado foi transferido para o marriott estéril e distribuído, assepticamente, o volume de 10 mL para cada tubo estéril. Os tubos foram tampados (meia rosca) e levados para o sorocoagulador, para a etapa de coagulação do meio.
- No sorocoagulador, os tubos foram inclinados e a temperatura para cozimento permaneceu na faixa de 78 a 85°C por aproximadamente 30 a 45 minutos. A coagulação é para solidificar o meio de cultura (Figura 4).



Figura 4: Etapa de coagulação do meio de cultura LJ.

Fonte: acervo pessoal

- Após a consistência ideal do meio ser atingida, os tubos permaneceram 12/24 horas em temperatura ambiente com as tampas afrouxadas, para eliminar a água de condensação;
- Ao término deste período, retirou-se os tubos das grades e as tampas foram fechadas completamente.

4.2 Preparação dos Kits para análise de desempenho

Primeiramente todos os tubos produzidos em cada lote passaram por inspeção visual, onde foram verificados os seguintes parâmetros:

Cor: Observou-se se todo o lote apresentou coloração homogênea, pois caso não ocorra infere-se que a etapa de homogeneização não foi completa durante a preparação do meio de cultura. Uma coloração mais clara pode ocorrer devido a uma alcalinidade do meio, menor concentração do verde de malaquita ou resíduo de detergente no tubo. Uma coloração mais escura pode indicar acidez do meio ou maior concentração do verde de malaquita.

Volume e inclinação: Foi verificado se após etapa de coagulação os tubos apresentavam 1 cm na parte inferior preenchido com o meio e o restante distribuído

em bisel, permitindo um espaço suficiente para uma boa leitura visual, terminando à uma de distância de 2 cm da rosca.

Consistência do meio: Foi observado se em todos os tubos, o meio de cultura estava firme e aderido à parede do tubo de forma que não se rompa no momento da semeadura.

Foram visualizados também aspectos como presença de bolhas, sujidades e precipitado e aspecto da embalagem primária (tampa e tubos íntegros).

Após inspeção os tubos foram identificados por etiqueta com a numeração do lote gerado na ficha de produção e separados de forma a compor cinco Kits, contendo 14 tubos, sendo eles; 6 tubos de LJ sem droga, 2 tubos de LJ com Rifampicina, 2 tubos de LJ com Isoniazida, 2 tubos de LJ com Etambutol e dois tubos de LJ com Estreptomicina. Em seguida os Kits receberam uma codificação de acordo com o ovo que foi utilizado na formulação, para que o técnico que realizar os testes de controle de qualidade não saiba de qual ovo se trata, e assim não ocorra influência. Sendo assim os Kits produzidos com ovos não embrionados foram codificados como X1, os Kits produzidos com ovos caipiras foram identificados com Y1, e os Kits produzidos com ovos orgânicos Z1 (Figura 5).



Figura 5: Kit de Lowenstein-Jensen pronto

Fonte: acervo pessoal

4.3 Testes do Controle de qualidade:

- **Verificação do pH:**

Foi medido o pH de uma amostra de cada lote de LJ sem droga produzido. Para tanto foi utilizado pHmêtro calibrado e verificado com soluções padrão. O critério de aceitação para pH do meio de cultura LJ sem droga é $7,1 \pm 0,3$.

- **Teste de Esterilidade:**

Para realização deste teste um Kit de cada lote foi incubado durante 48 horas em estufa bacteriológica, com temperatura controlada na faixa de $32,5 \pm 2$ °C. Verificado que não houve crescimento microbiano durante este período, esta amostra foi retirada da estufa e em seguida permaneceu em temperatura ambiente por mais 14 dias. Este procedimento se deve ao fato de que bactérias e fungos possuem faixas de temperatura diferentes para crescimento ótimo, podendo demorar até 14 dias para apresentar modificações visíveis no meio de cultura.

4.4 Teste de Sensibilidade (TS)

Para realizar os Testes de Sensibilidade, foram utilizadas cinco linhagens de diferentes perfis de resistência, pertencentes a um painel de proficiência nacional. Este perfil conhecido será comparado com os resultados obtidos nos testes de sensibilidade realizados pelo método automatizado e pelo método das proporções indireto utilizando LJ produzido com os três diferentes tipos de ovos para determinação do desempenho.

Para realização dos testes de sensibilidade, foi inicialmente realizado um subcultivo de cada linhagem de micobactéria previamente selecionada, em tubos do meio de cultura LJ sem droga, com o objetivo de aumentar a massa bacteriana.

A partir das colônias destes tubos, serão realizadas diluições de acordo com a metodologia de cada Teste de Sensibilidade, conforme registrado nas descrições abaixo.

4.4.1 Teste de Sensibilidade pelo Método das Proporções Indireto Utilizando LJ

- **Execução do Teste**

Para execução do teste foram utilizadas colônias de micobactérias observadas nos tubos de LJ sem droga, conforme descrito anteriormente.

Cada linhagem selecionada, foi transferida com o auxílio de um palito de madeira (o maior número de colônias possível), para um tubo de ensaio, previamente identificado, com pérolas e com aproximadamente 1 mL de água destilada. Em seguida cada tubo foi homogeneizado em agitador de tubos por cerca de 30 segundos, e logo após, colocado em repouso por dez minutos.

A partir da suspensão foram efetuadas as sucessivas diluições decimais até a diluição 10^{-6} de cada linhagem.

Foram identificados tubos com pérolas para a realização da suspensão das cepas anteriormente selecionadas, e tubos de ensaio para as diluições de 10^{-1} a 10^{-6} .

Cada lote de LJ produzido continha 5 kits para realização do teste, sendo que cada Kit foi utilizado para um tipo de linhagem diferente.

Cada tubo do Kit foi identificado com o número da diluição que seria inoculado, o número da linhagem, e o número do lote do meio de cultura com a determinada codificação.

Em seguida 0,1 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-6} referentes a cada cepa foram inoculadas nos tubos de LJ previamente identificados, da seguinte forma:

- 0,1 mL da diluição 10^{-6} em dois tubos de LJ sem droga;
- 0,1 mL da diluição 10^{-3} em dois tubos de LJ sem droga, e em cada tubo contendo droga;
- 0,1 mL da diluição 10^{-5} em dois tubos de LJ sem droga e em cada tubo contendo droga.

Após a inoculação das cepas em seus respectivos kits previamente identificados, os tubos foram acondicionados fechados com semi-rosca por sete dias em posição

inclinado em estufa bacteriológica à 35 ± 2 °C. Em seguida foram totalmente fechados e colocados em posição vertical.

- **Leitura e interpretação do Teste de Sensibilidade em meio LJ:**

A primeira leitura de crescimento das micobactérias foi realizada após 28 dias da data de inoculação no meio, e a leitura final após 42 dias.

A leitura dos tubos semeados foi realizada em bancada bem iluminada.

Para interpretação do TS observou-se para cada Kit testado as seguintes condições:

1. Crescimento maior que 100 UFC no tubo de LJ sem droga (tubo controle), onde foi inoculado a diluição 10^{-3} , pois permite detectar mutantes resistentes que possam estar em menor porcentagem (cerca de 1%) entre os bacilos inoculados.
2. Observou-se no tubo de LJ sem droga (controle), onde foi inoculada a diluição 10^{-5} , se apresentou colônias separadas e contáveis. Condição importante para a determinação da proporção quando se verifica a presença de colônias resistentes.
3. Foi verificado se existia uma boa correlação entre o número de colônias desenvolvidas em cada um dos tubos de meio de cultura inoculados com as suspensões das linhagens e o fator de diluição aplicado, assim validando as quantificações que foram realizadas.

Em seguida, foi calculada a média do número de unidades formadoras de colônias entre os tubos de mesma diluição inoculados no tubo controle (LJ sem droga).

Após isso, quantificou-se o número de UFC nos tubos de LJ contendo cada uma das drogas.

Por fim, foi calculada a porcentagem de UFC identificada na presença de cada droga, em relação à média de UFC registrados dos tubos controle. Conforme fórmula abaixo:

N° de colônias no tubo com drogas x100 = % de bacilos resistentes

N° de colônias no tubo controle.

Após realização do cálculo, foi verificado se a porcentagem encontrada foi superior ou igual à proporção crítica estabelecida para cada droga para que a linhagem seja considerada resistente, conforme quadro abaixo:

Quadro 2: Concentração crítica dos fármacos e proporção utilizada como critério de classificação de resistência.

DROGAS	CONCENTRAÇÕES (µg/ mL)	PROPORÇÕES(%)
Isoniazida (I)	0,2	1,0
Rifampicina (R)	40,0	1,0
Estreptomicina (S)	4,0	1,0
Etambutol (E)	2,0	1,0

4.4.2 Método automatizado utilizando meio líquido:

As linhagens utilizadas no teste de sensibilidade foram testadas em paralelo pela técnica automatizada com equipamento MGIT, utilizando ágar Middlebrook 7H9 modificado. Esta técnica se baseia na comparação da contagem de colônias em meio com ou sem fármacos. Os resultados das análises geralmente estão disponíveis em um intervalo de cinco a treze dias de incubação.

Neste método é utilizado um tubo indicador de crescimento de micobactérias, de 7 mL, contendo Caldo Middlebrook 7H9 modificado, o qual permite o crescimento e detecção de micobactérias. O tubo de dimensão de 16 x 100 mm contém um composto fluorescente embebido em silicone no fundo arredondado. Este composto fluorescente é inibido pela concentração inicial de oxigênio dissolvida no caldo, inibindo assim a emissão. Sendo assim, pouca fluorescência pode ser detectada inicialmente. Posteriormente, quando os microrganismos se encontram ativamente em crescimento, consomem o oxigênio, permitindo que a fluorescência presente no composto seja emitida.

O equipamento MGIT interpreta automaticamente os resultados, e reporta como resistente ou susceptível através da comparação da fluorescência emitida pelo tubo

controle, sem adição de fármacos, e a fluorescência emitida pelos tubos contendo os fármacos.

Para realização dos testes de sensibilidade das linhagens, foram utilizados frascos liofilizados de cada droga, Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol que foram resuspendidos e adicionados volumes de 100 µg/mL a cada tubo contendo o Caldo Middlebrook 7H9. A cada tubo também foi incorporado o suplemento SIRE. Os tubos utilizados no teste foram previamente identificados de acordo com a linhagem a ser testada e o fármaco a ser adicionado.

As drogas foram reconstituídas para obtenção das seguintes concentrações conforme Quadro 3:

Quadro 3: Concentração dos fármacos utilizados

Fármaco	Concentração da droga após reconstituição	Volume adicionado ao tubo MGIT para teste	Concentração final no tubo MGIT
Estreptomicina	83µg/mL	100 µg/mL	1,0 µg/mL
Isoniazida	83µg/mL	100 µg/mL	0,1 µg/mL
Rifampicina	83µg/mL	100 µg/mL	1,0 µg/mL
Etambutol	415µg/mL	100 µg/mL	5,0 µg/mL

Foram utilizados no teste 5 tubos para cada linhagem, sendo:

- Um o tubo controle que continha apenas os 7 mL do Caldo Middlebrook 7H9, 0,8 mL do suplemento SIRE
- Um tubo contendo 7 mL de Caldo Middlebrook 7H9, 0,8 mL do suplemento SIRE, 100 µg/mL da ressuspensão de Isoniazida
- Um tubo contendo 7 mL de Caldo Middlebrook 7H9, 0,8 mL do suplemento SIRE, 100 µg/mL da ressuspensão de Etambutol

- Um tubo contendo 7 mL de Caldo Middlebrook 7H9, 0,8 mL do suplemento SIRE, 100 µg/mL da ressuspensão de Rifampicina
- Um tubo contendo 7 mL de Caldo Middlebrook 7H9, 0,8 mL do suplemento SIRE, 100 µg/mL da ressuspensão de Estreptomicina

A partir das colônias de micobactérias observadas nos tubos de LJ sem droga, foi preparada a suspensão de cada uma das cinco linhagens selecionadas, as quais foram primeiramente ajustadas na escala 1,0 McFarland, e em seguida foi diluído 1mL desta suspensão em 3 mL de água estéril.

Após preparação da suspensão de microrganismo inicial de cada linhagem, deve-se fazer nova diluição de 1:100, para isso foi transferido asépticamente 0,1 mL da suspensão de microrganismo em 10 mL de salina estéril.

Para realização do teste foi pipetado 0,5 mL da suspensão de cada linhagem de microrganismo para um tubo controle e um tubo contendo cada fármaco, previamente identificados. Os tubos foram firmemente tampados e misturados com inversões suaves 3 ou 4 vezes.

Em seguida os tubos foram inseridos no equipamento, para incubação e leitura automática.

Após 13 dias foi retirado o relatório final, como será observado nos resultados observados abaixo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

- **Controle Visual:** Todos os tubos produzidos com os diferentes ovos em sua formulação passaram pela etapa de controle visual e foram observados os seguintes resultados frente aos parâmetros exigidos:

- **Cor:**

Lote X1 - o ovo não embrionado, destinado à pesquisa: apresentou cor verde clara em todo o lote, exceto os tubos com a droga Rifampicina, devido à cor da droga (vermelho). Coloração homogênea em todo o lote.

Lote Y1 – ovo caipira: apresentou cor verde um pouco mais escura do que o lote X1, devido à coloração da gema do ovo que é mais escura que a dos demais. Coloração homogênea em todo o lote.

Lote Z1 – ovo orgânico: apresentou cor verde clara em todo o lote, exceto os tubos com a droga Rifampicina, devido à cor da droga (vermelho). Coloração homogênea em todo o lote. Semelhante ao lote X1.

- **Volume e inclinação:** Foi verificado que os tubos dos três lotes (X1, Y1 e Z1) apresentaram tamanho da base e do bisel adequados, permitindo um espaço suficiente para uma boa leitura visual, terminando a uma de distância de 2 cm da rosca.
- **Consistência do meio:** Foi observado que todos os tubos dos três lotes analisados (X1, Y1 e Z1), os meios de cultura se apresentaram firmes e aderidos às paredes do tubo de forma que não se romperam no momento da semeadura.
- **Presença de bolhas, sujidades e precipitado:** Foi observado que todos os lotes (X1, Y1 e Z1) apresentaram mesma proporção de pequenas bolhas,

mas que não interferem no desempenho do meio. Nenhum lote apresentou sujidade ou precipitado.

- **Verificação do pH:** Foi medido o pH de uma amostra de cada lote de LJ sem droga produzido. O critério de aceitação para pH do meio de cultura LJ sem droga é $7,1 \pm 0,3$.

Foram registrados os seguintes valores de pH para as amostras de LJ sem droga de cada lote, conforme Quadro 4.

Quadro 4: Resultado de valores de pH das amostras de cada lote de Lowenstein-Jensen.

LOTE	pH
LJ sem droga lote com ovo não embrionado destinado a pesquisa	7,14
LJ sem droga lote com ovo caipira	7,15
LJ sem droga lote com ovo orgânico	7,18

- **Teste de Esterilidade:**

Foi incubado um kit de cada lote de LJ produzidos X1, Y1 e Z1, em estufa com temperatura controlada na faixa de $32,5 \pm 2$ °C por 48 horas. Foi verificado que não houve crescimento microbiano durante este período em nenhum dos Kits testados. Esta amostra foi retirada da estufa e em seguida permaneceu em temperatura ambiente por mais 14 dias. Após leitura, não foi observado crescimento de nenhum microrganismo, assim garantindo a esterilidade dos três lotes com diferentes ovos produzidos.

- **Leitura do crescimento das linhagens de micobactérias nos tubos de meios de cultura LJ sem droga:**

Após realização do subcultivo das cinco linhagens de micobactérias utilizadas no teste de sensibilidade, em meio LJ sem droga, foi observado crescimento registrado abaixo:

Quadro 5: Perfil de crescimento das cinco linhagens utilizadas nos testes de sensibilidade.

AMOSTRA PAINEL 16	REPIQUE 30 DIAS
416	(+)
675	08 UFC
777	07 UFC
853	(+++)
928	(++)

Legenda: S: Estreptomicina; I: Isoniazida; R: Rifampicina; E: Etambutol; R: resistente; S sensível;

Os critérios para leitura das culturas em meio sólido são apresentados na escala semiquantitativa baixo:

- ✓ Menos de 20 colônias: Registra-se o número de unidades formadoras de colônias;
- ✓ De 20 a 100 colônias: Registra-se como (+);
- ✓ Mais de 100 colônias separadas: Registra-se como (++);
- ✓ Colônias confluentes (tapete): Registra-se como (+++);

- **Leitura e interpretação do Teste de Sensibilidade em meio LJ após 28 dias**

Foi realizada a primeira leitura e interpretação do Teste de sensibilidade, após 28 dias da data de inoculação das linhagens nos Kits produzidos para o teste.

Foi observado que os três lotes apresentaram as condições necessárias para a interpretação do teste. Além disso, os três lotes apresentaram mesmo desempenho frente às linhagens testadas, pois foi possível detectar mesmo perfil de sensibilidade frente às drogas testadas. Estes dados podem ser verificados no Quadro 6 :

Quadro 2: Resultado do Teste de Sensibilidade após 28 dias de incubação dos lotes de Lowenstein-Jensen com inoculo de *Mycobacteria tuberculosis*.

AMOSTRA PAINEL 16	REPIQUE 30 DIAS	Ovo não embrionado				Ovo caipira				Ovo orgânico				MGIT			
		S	I	R	E	S	I	R	E	S	I	R	E	S	I	R	E
		28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	S	I	R	E
416	(+)	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S
675	08 UFC	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
777	07 UFC	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
853	(+++)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
928	(++)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: S: Estreptomicina; I: Isoniazida; R: Rifampicina; E: Etambutol; R: resistente; S sensível;

Foi realizada a primeira leitura e interpretação do Teste de sensibilidade, após 42 dias da data de inoculação das linhagens nos Kits produzidos para o teste. Foi observado que não houve alteração dos resultados em relação ao registrado após 28 dias da inoculação.

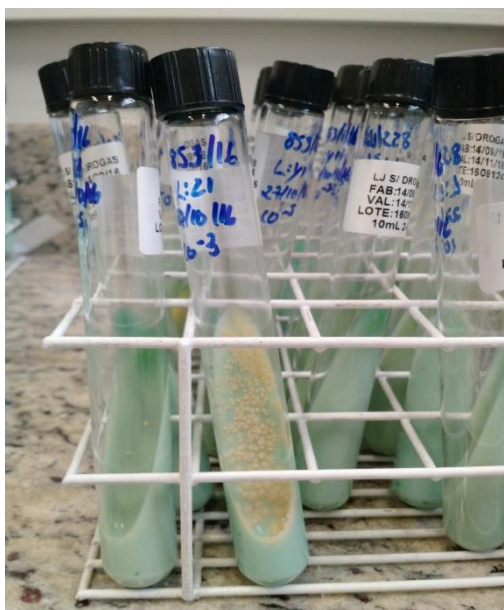


Figura 6: Crescimento de micobactéria linhagem 853 no lote de Lowenstein-Jensen produzido com ovo orgânico.

Fonte: acervo pessoal

Quadro 3: Resultado do Teste de Sensibilidade após 42 dias de incubação dos lotes de Lowenstein-Jensen com inoculo de *Mycobacteria tuberculosis*.

AMOSTRA PAINEL 16	REPIQUE 30 DIAS	Ovo não embrionado				Ovo caipira				Ovo orgânico				MGIT			
		S	I	R	E	S	I	R	E	S	I	R	E	S	I	R	E
		42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	S	I	R	E
416	(+)	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S
675	08 UFC	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
777	07 UFC	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
853	(+++)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
928	(++)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: S: Estreptomicina; I: Isoniazida; R: Rifampicina; E: Etambutol; R: resistente; S sensível;

Após análise de todos os testes realizados e registrados acima, foi verificado que os três lotes apresentaram resultados satisfatórios na análise de controle visual, faixa de pH, teste de esterilidade, e teste de sensibilidade, em relação aos critérios estabelecidos, além de demonstrarem desempenho muito semelhante.

Foi observada uma divergência entre o resultado obtido pelo método MGIT em relação ao perfil de sensibilidade da linhagem 416 frente ao fármaco Etambutol e o perfil de sensibilidade já conhecido por método de biologia molecular desta mesma linhagem. No entanto, os três lotes de LJ produzidos com os três diferentes tipos de ovos apresentaram resultado idêntico ao perfil de resistência previamente conhecido.

Esta divergência pelo método de cultura automatizado pode ter ocorrido devido a uma maior instabilidade que o Etambutol apresenta no mesmo, além disso, este apresenta sensibilidade inferior ao método das proporções utilizando meio de cultura LJ com a adição de fármacos, considerado padrão ouro, e neste não foi evidenciado nenhuma divergência entre os três lotes produzidos com os diferentes tipos de ovos.

Para um processo de fabricação de produtos para saúde é de grande relevância a utilização de insumos com certificação de qualidade e rastreabilidade de lote. Portanto, apesar de todos os três lotes produzidos com os diferentes tipos de ovos apresentarem desempenho satisfatório, o ovo caipira não possui certificação adequada dos lotes produzidos que garanta segurança para sua utilização como insumo. Apenas o ovo orgânico e o ovo não embrionado destinado à pesquisa possuem certificação adequada, conforme descrito na metodologia acima.

O preço do ovo não embrionado destinado à pesquisa, atualmente utilizado, é em média dezoito vezes mais caro do que o ovo orgânico. Sendo assim, ao realizarmos a substituição na formulação pelo ovo orgânico, o custo anual com o ovo para a produção dos meios de cultura utilizados no diagnóstico da tuberculose, passaria em média de R\$102.000,00 para R\$5.000,00.

6 CONCLUSÕES

Os três lotes produzidos com os diferentes tipos de ovos, ovo orgânico, ovo caipira e ovo não embrionado destinado à pesquisa, demonstraram grande concordância em relação aos resultados obtidos.

Todos os lotes apresentaram resultados satisfatórios de acordo com os critérios de controle de qualidade estabelecidos.

Podemos concluir com os resultados obtidos no teste, que o meio de cultura LJ produzido com o ovo orgânico, atende a todos os critérios de qualidade exigidos, rastreabilidade de todo o lote, além de tornar viável a comercialização, pois diminui drasticamente o custo da produção. Sendo assim, temos uma economia de 95%, sem nenhum impacto na qualidade do produto.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde: **Deteção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica**: módulo 7. Brasília, 2013.

BENTO, João et al. **Diagnostic tools in tuberculosis**. Acta medica portuguesa, v. 24, n. 1, p. 145-154, 2011.

BICA, Claudia Giuliano. **Identificação e diferenciação de bactérias do gênero Mycobacterium empregando a técnica de reação em cadeia da polimerase**. 2003. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 64 de 18/12/2008. **Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal**. Publicado no Diário Oficial de União, Brasília, 19 de dezembro de 2008. Seção 1, p. 21.BRASIL.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília, 2008. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf>. Acesso em 19 de dez 2016.

BRASIL. Ministério da saúde. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília, 2011a. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf>. Acesso em 22 de dez de 2016.

CAMPOS, Hisbello S. et al. **Diagnóstico da tuberculose. Pulmão RJ**, v. 15, n. 2, p. 92-99, 2006.

CARVALHO, Fátima Aparecida Ferreira Teixeira de et al. **A tuberculose através dos séculos: série histórica para a mortalidade no município de Santos, São Paulo**, Brasil, 1854-5010. 2011.

CERTIFICADO GRANJA TOLOMEI. 2017

DANIEL, Thomas M. The history of tuberculosis. **Respiratory medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862-1870, 2006.

DAROLT, Moacir Roberto. **A qualidade nutricional do alimento orgânico é superior ao convencional**. 2001.

DE LOUREIRO MAIOR, Marina et al. **Tempo entre o início dos sintomas e o tratamento de tuberculose pulmonar em um município com elevada incidência da doença**. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 38, n. 2, p. 202-209, 2012.

DUCATI, Rodrigo Gay et al. The resumption of consumption: **a review on tuberculosis**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

FERREIRA, Aurigena Antunes de Araújo et al. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: **uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública**. Rev. bras. epidemiol, v. 8, n. 2, p. 142-149, 2005.

FRIEDEN, T. R.; SBARBARO, J. A. Promoting adherence to treatment for tuberculosis: **the importance of direct observation**. Bulletin of the World Health Organization, Geneva, v. 85, n. 5, p. 407-409, May 2007.

GUERRA, Renata Leborato; REGO, Luciana; CONDE, Marcus Barreto. **Diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com baciloscopia direta de escarro negativa**. Pulmão RJ, v. 17, n. 2-4, p. 87-90, 2008.

MENDES, Aderlaine de Melo; FENSTERSEIFER, Lísia Maria. Tuberculose: **porque os pacientes abandonam o tratamento?**. Boletim de Pneumologia Sanitária, v. 12, n. 1, p. 27-38, 2004.

Ministério da saúde. **Detecção e identificação de micobactérias de importância médica**. Brasília, 2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_6_2004.pdf>. Acesso em 01 dez 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global tuberculosis report 2016**. 2016. Disponível em:< http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ >. Acesso em: 21 dez. 2016.

Souza, Julio Seabra Inglez, Aristeu Mendes Peixoto, and Francisco Ferraz de Toledo. *Enciclopédia agrícola brasileira: AB*. Vol. 3. EdUSP, 1995.