

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

CARLOS GUSTAVO VIEIRA DE MORAIS

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO EXAME DE  
BACILOSCOPIA EM MEMBRANA DE POLICARBONATO APÓS  
CONCENTRAÇÃO PELO SISTEMA BACFIL PARA O DIAGNÓSTICO DA  
TUBERCULOSE PULMONAR.**

VITÓRIA  
2009

CARLOS GUSTAVO VIEIRA DE MORAIS

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO EXAME DE  
BACILOSCOPIA EM MEMBRANA DE POLICARBONATO APÓS  
CONCENTRAÇÃO PELO SISTEMA BACFIL PARA O DIAGNÓSTICO DA  
TUBERCULOSE PULMONAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências - Patologia das Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Solange A. Vinhas

Vitória

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

M827p      Morais, Carlos Gustavo Vieira de, 1981-  
              Padronização e avaliação da acurácia do exame de  
              baciloscopia em membrana de policarbonato após concentração  
              pelo sistema BacFil para o diagnóstico da tuberculose pulmonar /  
              Carlos Gustavo Vieira de Morais. – 2009.  
              95 f. : il.

              Orientador: Moisés Palaci.  
              Co-Orientador: Solange Alves Vinhas.  
              Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito  
              Santo, Centro de Ciências da Saúde.

              1. Tuberculose - Diagnóstico. 2. Exame de escarro. 3.  
              Baciloscopia. I. Palaci, Moisés. II. Vinhas, Solange Alves. III.  
              Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da  
              Saúde. IV. Título.

---

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS  
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

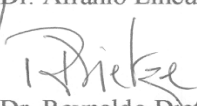
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O mestrando CARLOS GUSTAVO VIEIRA DE MORAIS, apresentou dissertação intitulada: “PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO EXAME DE BACILOSCOPIA EM MEMBRANA DE POLICARBONATO APÓS CONCENTRAÇÃO PELO SISTEMA BACFIL PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar o biólogo CARLOS GUSTAVO VIEIRA DE MORAIS, a obter o Grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – PATOLOGIA GERAL DAS DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 16 de fevereiro de 2009

  
Prof. Dr. Afrânio Lineu Kritski

  
Prof. Dr. Reynaldo Dietze

  
Prof. Dr. Moises Palaci  
(Orientador)

**A Deus,  
Por proporcionar  
A realização de um sonho.**

**À minha família Carlos, Fátima e Otávio  
Que sempre foram um alicerce e fonte  
De inspiração.**

**À Juliana, eterno amor,  
Por segurar em minhas mãos em  
Todos momentos de dificuldade .  
E à minha mãe científica, Solange,  
Que nunca poupou esforços, e me orientou não  
Somente para a vida acadêmica,  
Mas para enfrentar a vida de frente.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Moisés Palaci, pela disposição para ensinar não somente no período do mestrado, mas também, na formação de um profissional, que aprendeu observar as diferentes visões de um mesmo assunto. Muito Obrigado.

Ao Prof. Dr Reynaldo Dietze, por nos acolher no Núcleo de Doenças Infecciosas e possibilitar nosso ingresso no mundo da pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Espinosa Barbosa Miranda, coordenadora da pós – graduação, meu respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Fausto E. L. Pereira, por ensinar sempre a buscar mais e pela incansável vontade de ensinar.

A todos os professores do curso de pós-graduação, pelo aprendizado proporcionado.

À amiga Renata Lyrio Peres de Nóbrega, por sempre estar disposta a ajudar, companheira de todas as horas, de praticamente todos os seminários e principalmente de todos os momentos de tensão. Obrigado por acolher minhas reclamações. Agora está acabando...

À também amiga Aretha Molina Sesana, companheira de experimentos, aulas, seminários e momentos difíceis, obrigado por ser um ombro amigo.

Aos amigos do mestrado, pelos momentos de convivência inesquecíveis, onde aprendi muito.

Aos colegas do Laboratório de Micobacteriologia Cynthia Pinheiro, Fabíola Ribeiro, Hildete N. Silva, João Batista P. Silva, Ledüç Magesk, Maria Guimarães, Thiago Prado, pela amizade e disposição em me ajudar.

À Fátima Aparecida Pereira, secretária da pós – graduação, pela amizade e auxílio nas questões administrativas.

Ao Dr. David Jamil Hadad e as enfermeiras do Centro de Pesquisa Clínica e Unidades Básicas de Saúde, pela triagem e avaliação dos pacientes deste estudo.

À amiga Daniela Mill Damasceno, pela colaboração na triagem de pacientes, e companhia em momentos que nunca esperei estar presente.

Aos amigos do NDI, Elenice, Ethel, Rodrigo, Carla, Valéria, Janete, Marco André, Juliana e Luiza.

Aos pacientes com tuberculose que participaram desta pesquisa que vivem na expectativa de dias melhores.

***O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.***

**José de Alencar**



## RESUMO

A baciloscopia é o principal método para o diagnóstico da Tuberculose (TB), em razão de sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Porém sua sensibilidade é baixa, principalmente nas formas paucibacilares da doença o que corrobora a necessidade de aprimoramento ou desenvolvimento de novas metodologias. Diante deste fato, nos propusemos padronizar e avaliar a acurácia do exame de baciloscopia em membrana de polycarbonato após concentração de amostras de escarro por filtração (Sistema BacFil), para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. Na primeira fase do estudo foram avaliados os componentes do protótipo do sistema e estabelecido suas condições operacionais. Na segunda fase, para avaliação do sistema, um total de 450 amostras de escarro espontâneo de 331 pacientes com suspeita clínica de TB foi submetido à confecção de esfregaços diretos, em seguida, digerido com NALC e dividido em duas alíquotas. Uma alíquota foi concentrada e submetida ao exame de cultura para micobactérias e ao exame de baciloscopia. A segunda alíquota foi tratada com uma solução contendo hipoclorito de sódio, etanol e Triton e em seguida filtrada através de membranas de 13 mm com poros de 0,8 $\mu$ m pelo Sistema BacFil. Após o procedimento de filtração as membranas foram transferidas para lâminas, coradas e examinadas semi-quantitativamente no microscópio. Ao analisarmos os resultados deste estudo verificamos que o Sistema BacFil proporcionou uma sensibilidade de 90,8% (82,7 – 95,9) e especificidade de 100% quando comparado ao exame de cultura. Superior as sensibilidades de 64,4% (53,4 – 74,3) e 59,5% (43,3 – 74,4) encontrados respectivamente pelos métodos de concentração por centrifugação e esfregaço direto. Ao avaliarmos criticamente a performance deste método constatamos ainda que o mesmo apresenta segurança operacional, elevada acurácia para o diagnóstico, baixo custo econômico e dispensa o uso de centrifuga. Apesar de reunir estas características que o credencie como um método promissor para o diagnóstico rápido da tuberculose, consideramos ainda que este protótipo (BacFil) deva ser aperfeiçoado e submetido a um estudo multicêntrico (Fase III) para validar a sua performance no diagnóstico da tuberculose pulmonar em condições de rotina.

## ABSTRACT

Microscopy smear is the primary method for diagnosing pulmonary tuberculosis (TB). The method is fast, inexpensive, and specific for *Mycobacterium tuberculosis*. However, its sensitivity is relatively low, especially in patients with paucibacillary disease which emphasizes the need for improving and/or development of new methodologies. In this context, the aim of this study was to standardize and assess the accuracy of smear microscopy using polycarbonate membranes after centrifugation of sputum samples by filtration (BacFil System) in TB diagnosis. First, we evaluated the system components and established its operating conditions. Then, to assess the system performance, a total of 450 spontaneous sputum samples from 331 patients suspected of having TB was submitted to direct smear and, after that, digested with NALC and divided into two aliquots. One aliquot was concentrated and submitted to smear microscopy and culture, while the other was treated with a solution containing sodium hypochlorite, ethanol and Triton and filtered through 13mm membranes with 0,8µm pore size in the BacFil System. After filtering, the membranes were transferred to slides, stained and a microscopic semi-quantitative analysis was done. The BacFil System showed a sensitivity of 90,8% (82,7 – 95,9) compared to 64,4% (53,4 – 74,3) and 59,5% (43,3 – 74,4) for the centrifugation method and direct smear, respectively. The method demonstrated a highly significant enhancement in sensitivity, operational safety, low cost and also spares the use of a centrifuge. Although BacFil is a very promising method for early diagnosis of TB, we consider it must be improved and evaluated in a multicentric study (Phase III) before its use in a laboratory routine.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	do inglês “Acquired Immunodeficiency Syndrome” ou Síndrome da Imunodeficiência Humana
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
BCG	bacilo biliado de Calmette-Guérin
°C	grau Celsius
DNA	ácido desoxiribonucléico
et al.	e colaboradores
X g	força centrífuga
HIV	do inglês “Human Immunodeficiency Virus” ou Vírus da Imunodeficiência Humana
ml	mililitros
µl	microlitros
µm	micromilímetros
mmHg	milímetros de mercúrio
NALC – NaOH	N-acetil-L-cisteína com hidróxido de sódio
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase
PNB	ácido p-nitrobenzóico
RPM	Rotações por minuto
TB	tuberculose
TCH	ácido 2-tiofenocarboxílico
WHO	do inglês “World Health Organization” ou Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Crítérios para Leitura e Interpretação dos Resultados da Baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen	29
<b>Quadro 2</b>	Número de BAAR observados nas baciloscopias, concentrações de bacilos cultiváveis nos escarros e probabilidade de resultados positivos	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Diferenciação entre o Complexo <i>M. Tuberculosis</i> e micobactérias não causadoras de tuberculose (NTM)	32
<b>Tabela 2</b>	Escala de concordância Kappa	57
<b>Tabela 3</b>	Análise qualitativa do desempenho dos materiais utilizados no sistema BacFIL	60
<b>Tabela 4</b>	Análise qualitativa do desempenho das soluções mucolíticas utilizadas no sistema BacFIL	61
<b>Tabela 5</b>	Características dos pacientes selecionados para o estudo	62
<b>Tabela 6</b>	Comparação de três diferentes métodos de baciloscopia com o exame de cultura para micobactérias	63
<b>Tabela 7</b>	Análise dos resultados de baciloscopia diretas, após centrifugação e após filtração pelo Sistema BacFil, em relação aos resultados de cultura	64
<b>Tabela 8</b>	Análise da sensibilidade da baciloscopia pelo Sistema BacFil e após centrifugação em pacientes paucibacilares	65
<b>Tabela 9</b>	Valores de Concordância das leituras baciloscópicas Intra e Entre - Leitores e da Leitura Padrão	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Número estimado de casos de tuberculose em 2006	22
<b>Figura 2</b>	Esquema de processamento de amostras para a realização de cultura e filtração de espécimes	49
<b>Figura 3</b>	Montagem do sistema de Filtração de amostras BacFil	52
<b>Figura 4</b>	Processo de filtração de espécimes de escarro utilizando o sistema BacFil	53
<b>Figura 5</b>	Concentração de BAAR por campo microscópico de cada um dos métodos de baciloscopia testados	67

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Resultado da análise semiquantitativa da baciloscopia dos esfregaços diretos, centrifugados e filtrados pelo Sistema BacFil	66
<b>Gráfico 2</b>	Incremento da sensibilidade pela segunda amostra nos diferentes métodos de esfregaço utilizados	68

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1	Histórico .....	20
1.2	Aspectos Epidemiológicos .....	21
1.2.1	Agente Etiológico .....	23
1.2.2	Patogenia e Transmissão.....	25
1.2.3	Características Gerais da Doença.....	26
1.3	Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar.....	26
1.3.1	Diagnóstico Clínico.....	26
1.3.2	Diagnóstico Radiológico.....	27
1.3.3	Diagnóstico Microbiológico.....	28
1.3.3.1	Microscopia .....	28
1.3.3.2	Cultura.....	29
1.3.3.3	Identificação do <i>M. tuberculosis</i> .....	31
	Identificação Fenotípica do <i>M. tuberculosis</i> .....	31
	Identificação Molecular do <i>M. tuberculosis</i> .....	32
1.3.4	Métodos Complementares para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar....	33
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>36</b>
2.1	Considerações Gerais.....	36
2.2	Métodos Utilizados para o Exame de Baciloscopia.....	37
2.2.1	Método de Esfregaço Direto de Escarro.....	38
2.2.2	Método de Digestão e Centrifugação de Escarro .....	38
2.2.3	Método de Sedimentação.....	40
2.2.4	Método de Filtração.....	40
2.3	Antecedentes e Justificativa do Projeto.....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>45</b>
3.1	Objetivo Geral.....	45
3.2	Objetivos Específicos .....	45



<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1	Modelo de Estudo .....	47
4.2	Padronização do Sistema de Filtração.....	47
4.3	Caracterização das Amostras .....	48
4.4	Coleta das Amostras .....	48
4.5	Exames Laboratoriais.....	49
4.5.1	Esfregaço Direto.....	50
4.5.2	Digestão das Amostras de Escarro .....	50
4.5.3	Divisão das Amostras de Escarro .....	50
4.5.4	Descontaminação das Amostras para Realização de Cultura .....	50
4.5.5	Descontaminação das Amostras para Realização de Filtração .....	51
4.5.6	Cultura em Meio Ogawa.....	51
4.5.7	Confecção dos Esfregaços Após Centrifugação .....	51
4.5.8	Filtração das Amostras de Escarro .....	52
4.5.9	Identificação dos Isolados de Micobactérias .....	54
4.5.10	Coloração e Leitura dos Esfregaços Confeccionados.....	54
4.5.11	Estudo de Proficiência Para a Leitura de Esfregaços .....	55
4.6	Análise Estatística .....	56
4.7	Comissão de Ética .....	57
4.7.1	Termo de Consentimento.....	57
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
5.1	Padronização do Sistema de Filtração.....	59
5.1.1	Avaliação do Desempenho dos Componentes do Sistema BacFil.....	59
5.1.2	Avaliação do Desempenho das Soluções Utilizadas no Sistema BacFil...	60
5.2	Acurácia do Sistema BacFil para o Diagnostico da Tuberculose Pulmonar..	62
5.3	Avaliação dos Padrões de Concordância Intra - Leitores.....	69
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>

<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
----------	---	-----------

*Introdução*

---

## **1 Introdução**

### **1.1 Histórico**

A tuberculose (TB) é uma doença que caminha ao lado do homem desde os tempos do velho testamento. Evidências de TB foram localizadas em um esqueleto de uma criança do período neolítico (aproximadamente 9.000 anos A.C.), encontrado em Atlit, localizada ao sul de Haifa em Israel (HERSHKOVITZ et al., 2008). Descrições sobre as manifestações da doença existem desde a Antigüidade, particularmente entre os gregos. Os egípcios, considerados um dos povos mais sadios da antigüidade, percebendo a progressão em cadeia da TB, mantinham seus doentes em isolamento. (HAAS & HAAS, 1996; DANIEL, 1997; MURRAY, 2004).

Entre os árabes, no século XI, Avicenna compartilhava da opinião que a TB possuía natureza transmissível. Na Renascença, por volta do século XVI, o médico italiano Girolamo Fracastoro intuiu que a doença seria transmitida por via aérea através de um provável agente vivo eliminado pelos doentes (“miasmas”), e também recomendava o isolamento sanatorial como forma de controle. Essa idéia predominou até meados do século XIX.

No século XVIII, a TB adquiriu o nome de Peste Branca em oposição à Peste Negra (Bubônica), com altos índices de mortalidade na Europa, principalmente em meados do século. Em razão disso, o rei da Espanha, Fernando VI, ordenou que os médicos informassem as autoridades de saúde todos os casos de TB. (HOLMBERG, 1990).

Somente em 1865, Jean Antoine Villemin demonstrou experimentalmente a transmissão aérea da TB através do desenvolvimento da doença em cobaias expostas aos indivíduos doentes. Villemin propôs que um agente vivo seria o responsável pela doença, organismo esse, identificado em 1882 por Robert Koch.

A identificação do bacilo como agente etiológico foi um marco fundamental para o conhecimento da doença. A descoberta dos raios – X por Wilhem Conrad von Roentgen, em 1895, trouxe outra importante contribuição para o diagnóstico e acompanhamento da TB. No campo da radiologia destacou-se o brasileiro Manoel

Dias de Abreu que, com a invenção da roentgenfotografia em 1936, posteriormente aclamada como abreugrafia, possibilitou o estudo radiológico em massa da população e de baixo custo. (GIKOVATE & NOGUEIRA, 1976)

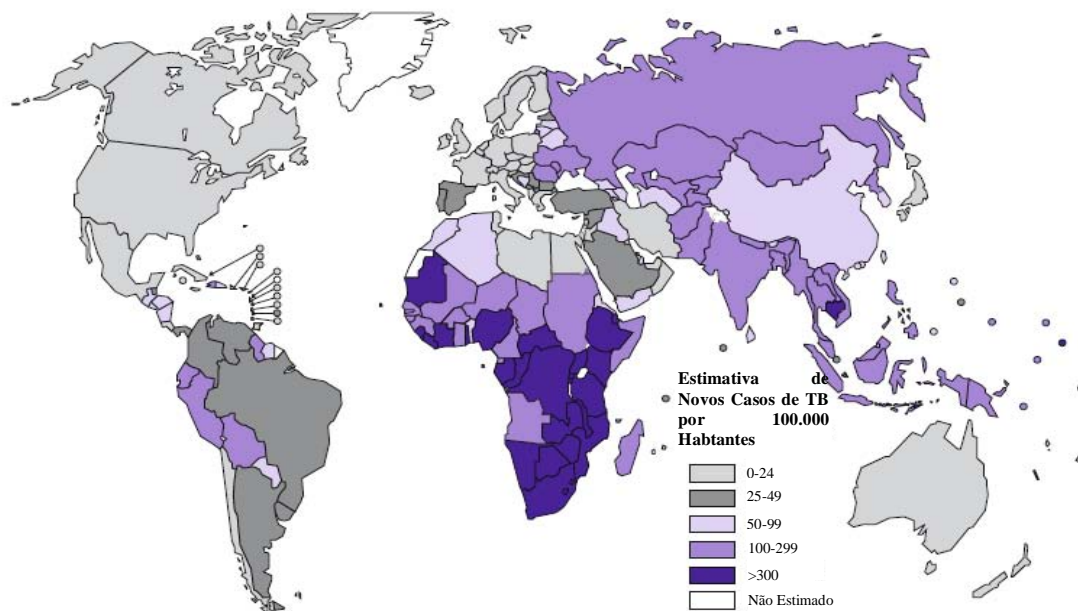
Nas Américas, durante muitos anos acreditou-se que a TB teria sido trazida por europeus doentes que aqui aportaram após o seu descobrimento por Colombo em 1492. Porém, estudos recentes de biologia molecular demonstraram fragmentos de DNA do agente etiológico em múmia peruana de um menino falecido por volta do ano 1300, comprovando que a TB já estava presente nesse continente antes do seu descobrimento (HAAS & HAAS, 1996; MACKOWIAK et al., 2005).

No Brasil, alguns colonizadores jesuítas chegavam doentes e mantinham contatos permanentes com os índios, infectando dezenas de nativos (SANTOS NEVES, 1984).

Segundo relatos históricos, o Beato José de Anchieta se manifestava dizendo que “Deus lhe dera a coluna curva para carregar os fardos pesados”. O padre jesuíta, portador de uma espondilite tuberculosa, que lhe conferiu a corcunda característica, foi um dos portadores que trouxeram a TB à Capitania do Espírito Santo quando aportaram na região (SANTOS NEVES, 1984).

## 1.2 Aspectos Epidemiológicos

A Organização Mundial de Saúde estima que um terço da população mundial esteja infectada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), agente causador da TB. Em 2006, estimou-se a ocorrência de 9,2 milhões de casos novos de TB. No mesmo período 1,7 milhões de pessoas morreram de TB, incluindo 200.000 pacientes infectados com HIV. No Brasil, nesse mesmo ano, foram estimados 110.000 novos casos, resultando em um coeficiente de incidência anual médio de 50 casos/100.000 habitantes. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2008) o país ocupa a 15ª posição entre os 22 países que abrigam cerca de 80% de todos os casos de TB no mundo (WHO, 2008) (**FIGURA 1**).



**FIGURA 1** – Número estimado de casos de tuberculose em 2006.  
Fonte: Adaptado WHO, 2008

O Espírito Santo possui oito municípios prioritários que correspondem a uma cobertura de 10,9% do Programa de Controle da Tuberculose – PCT implantado no estado e 100,0% de cobertura da estratégia de tratamento supervisionado. Desta forma, o estado apresenta uma incidência de 38,0 casos/100.000 habitantes para a TB em todas as formas e uma incidência de 24,6 casos/100.000 habitantes para os casos bacilíferos. A incidência média do estado está, portanto, abaixo da média da Região Sudeste, que é de aproximadamente 47 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2007).

Nesse cenário epidemiológico, a co-infecção MTB/HIV ocupa lugar de destaque devido ao seu grande impacto econômico e social, fazendo-se conhecer por muitos como o “dueto amaldiçoado”, (SHARMA et al., 2005). Nesses pacientes o risco de desenvolver a TB após a infecção primária é substancialmente aumentado (HAVLIR & BARNES, 1999; LIBERATO et al., 2004), podendo ainda ocorrer a reativação de uma infecção latente (NUNN et al., 2005). Diversas evidências sugerem que a co-infecção MTB/HIV seja responsável pelo aumento na incidência da TB em várias

regiões do mundo. Nos países em desenvolvimento, a TB representa a infecção oportunista mais freqüente em pacientes HIV/AIDS (NARAIN, 2004).

Entre os casos de AIDS notificados pelo Ministério da Saúde, no Brasil, a TB ocupa, desde 1996, o segundo lugar entre as infecções oportunistas mais freqüentes, sendo superada apenas pela candidíase oral. (BRASIL, 2002).

Nos últimos decênios, além das conseqüências diretas dessa infecção, passou-se a reconhecer também a crescente intratabilidade com as drogas antituberculose disponíveis. Este fenômeno, determinado pelo surgimento de mutantes bacterianos resistentes a drogas, em decorrência do tratamento irregular e/ou inadequado da TB, tornou-se questão de relevância mundial (PABLO-MENDES et al., 1998).

### 1.2.1 Agente Etiológico

O cientista alemão Robert Koch em um de seus mais completos e expressivos estudos apresentou à comunidade científica, em 1882, o isolamento e forma de cultivo, a partir de trabéculos macerados, do *Mycobacterium tuberculosis*, identificado como o agente etiológico da doença, e que ficou mais conhecido como bacilo de Koch. Por essa grande contribuição à ciência e à sociedade, Koch recebeu o prêmio Nobel de Medicina em 1905. Alguns anos antes, em 1868, Gerard Hansen descreveu o bacilo de Hansen, que juntamente com o bacilo de Koch foi incluído no gênero *Mycobacterium*, descrito, taxonomicamente, por Lehmann e Neumann em 1896 (LEHMANN; NEUMMAN, 1896; apud GRANGE, 1996).

O gênero *Mycobacterium*, pertence à família *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacterineae*, ordem *Actinomycetales*, que compreende pequenos microrganismos em forma de bastão, com dimensões de 0,2-0,7 x 1,0-10 µm, imóveis, não possuem flagelos, não formam esporos e não são encapsulados. Esses microrganismos diferem dos demais gêneros bacterianos em uma série de aspectos, muitos dos quais relacionados à composição de sua parede celular, que se apresenta com uma grande quantidade e variedade de lipídeos que agem na formação do granuloma. Estima-se que, aproximadamente, 60% do peso seco

sejam devido à presença de ácidos graxos tais como ácidos micólicos e ceras, o que lhe confere resistência peculiar ao álcool-ácido, evidenciada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen, além da resistência a álcalis, ácidos, antissépticos e a um amplo espectro de antibióticos. Esses organismos são, ainda, relativamente sensíveis ao calor e a radiação ultravioleta, o que lhes confere o poder de permanecer latente por anos dentro do hospedeiro (WAYNE & KUBICA, 1986).

Apesar da abundância de espécies existentes no gênero, 133 espécies e 11 subespécies são reconhecidas oficialmente até o momento, apenas algumas representantes do mesmo se adaptaram a algum tipo de hospedeiro ou se tornaram patogênicas para animais e humanos. Dentre as que merecem destaque, está o *M. tuberculosis* que, sem hospedeiros intermediários, reservatórios no meio ambiente ou vetores, encontrou no homem o seu reservatório natural e mantenedor da espécie (WOLINSKY, 1979; EUZÉBY, 2008).

Os bacilos que causam a TB estão agrupados no Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por *M. tuberculosis*, responsável pela maioria dos casos de TB humana; *M. bovis*, causador da doença em gado e eventualmente em outros tipos de animais, inclusive o homem; a cepa atenuada *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guérin), utilizada para vacinação; *M. africanum*, um grupo heterogêneo de isolados responsáveis pela TB na África (METCHOCK et al., 1999); *M. microti*, um patógeno isolado com pouca frequência, causador da doença em imunocomprometidos (VAN SOOLINGEN et al., 1998); *M. pinnipedii*, isolado em animais marinhos (COUSINS et al., 2003); além das subespécies recentemente identificadas - *M. tuberculosis* subsp. *caprae*, encontrada principalmente em caprinos (ARANAZ et al., 1999) e *M. tuberculosis* subsp. *canetti*, isolada na África e na Europa (MILTGEN et al., 2002).

O *M. tuberculosis* é um bacilo aeróbio estrito, considerado intracelular facultativo por sua capacidade de multiplicar e sobreviver no interior de células fagocitárias. Seu tempo de geração é longo, de 14 a 18 horas, em temperaturas próximas a 37°C. A tensão de oxigênio existente nos pulmões, o longo tempo para o crescimento em cultura e o longo tempo para o tratamento da doença explica o tropismo dessa bactéria pelo órgão. (METCHOCK et al., 1999; KAUFMANN, 2001).



### **1.2.2 Patogenia e Transmissão**

Quando pessoas com TB pulmonar tosem, espirram ou falam, emitem pequenas gotículas, conhecidas como gotículas de Wells, com menos de 25µm de diâmetro, que evaporam instantaneamente, deixando os bacilos livres. Uma vez inaladas por hospedeiros humanos, as gotículas, se pequenas o bastante, depositam-se nos alvéolos pulmonares, onde já se afirmou que constantemente um único organismo é o suficiente para iniciar a infecção (MUSHER, 2003).

O contato do *M. tuberculosis* com o hospedeiro pode levar às seguintes conseqüências: (i) imediata eliminação do patógeno; (ii) infecção crônica ou latente; (iii) rápida progressão da doença, doença primária, que ocorre entre 3 a 10% dos casos; ou ainda, (iv) a reativação da doença, que pode ocorrer vários anos após a exposição inicial (FISHMAN, 1998).

Uma vez dentro dos alvéolos, a resposta imunológica humana se inicia com a produção de citocinas e quimiocinas pelas células fagocitárias destruídas, resultando assim em um acúmulo de monócitos e macrófagos. Esse aglomerado celular forma a lesão tuberculosa microscópica inicial, onde há poucas células mortas ou necrose de tecido. Nesse período os bacilos se multiplicam dentro dos macrófagos acumulados. Após 2 a 4 semanas, ao mesmo tempo em que os macrófagos do hospedeiro desenvolvem uma habilidade para matar os bacilos contidos dentro deles, muitos começam a ser mortos pelos bacilos ou por seus produtos. Neste estágio, a lesão tuberculosa, também conhecida como tubérculo, forma um centro caseoso (do latim *caseus*, que significa queijo), que contém núcleo necrótico no centro e tecido granuloso contendo macrófagos viáveis, linfócitos e outras células na periferia. No momento da formação da lesão caseosa o hospedeiro torna-se reator à tuberculina, que é a primeira evidência clínica de que uma pessoa foi exposta ao agente infeccioso. Isso ocorre normalmente de 1 a 2 meses após a exposição inicial (DANNENBERG, 1989; FISHMAN, 1998).

A lesão caseosa pode adotar as seguintes conseqüências: cicatrizar e estabilizar; aumentar e disseminar bacilos para o sistema circulatório ou canais linfáticos; ou ainda liquefazer e formar uma cavidade. Este cenário tardio que resulta num rápido

e irrestrito crescimento do bacilo e finalmente, entrada para os brônquios, permite a disseminação dos bacilos para o ambiente externo (FISHMAN, 1998).

Geralmente, os sinais e sintomas da TB pulmonar são os mesmos observados em outras enfermidades respiratórias (tosse, suores noturnos e febre), sendo a extensão temporal destas manifestações um dado indicativo da doença (GARAY, 2004).

### **1.2.3 Características Gerais da Doença**

A tuberculose é uma doença infecciosa, de curso crônico, que acomete com maior frequência os pulmões (80 a 90% dos casos detectados nos adultos) (BRASIL, 2002b) e apresenta como principais sinais e sintomas: tosse, expectoração por mais de 3 semanas, febre baixa e emagrecimento. O quadro clínico da tuberculose pulmonar pode incluir ainda outras manifestações respiratórias como dispnéia, dor torácica e hemoptise. Essa doença também pode comprometer sítios extrapulmonares. Nesse caso, os principais sítios de implantação são aqueles com maior suprimento sanguíneo e, portanto, de oxigênio, como o córtex renal, o córtex cerebral, as extremidades de crescimento dos ossos longos, as vértebras e adrenais. Na tuberculose disseminada ou miliar, ocorre o comprometimento extensivo dos pulmões, fígado e medula óssea. Algumas condições debilitantes, tais como desnutrição, idade avançada, estresse, dependência química, doenças degenerativas e imunossupressoras são consideradas fatores intrínsecos ao organismo e constituem riscos para o desenvolvimento de ambos os tipos de tuberculose (BRASIL, 2002).

## **1.3 Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar**

### **1.3.1 Diagnóstico Clínico**

O diagnóstico clínico da tuberculose segue o caminho da anamnese e do exame físico do paciente. A história familiar, informações sociais, doenças anteriores e a história de contato prévio com pacientes portadores da doença, constituem dados

importantes, que conduzem à formulação de hipóteses acerca do diagnóstico. É recomendado que o diagnóstico clínico seja confirmado com o auxílio de exames complementares, contudo, alguns pacientes podem ser diagnosticados com base apenas na forte suspeita clínica e resposta ao tratamento anti-TB, mesmo na ausência da confirmação bacteriológica (CHAN et al., 2000).

### **1.3.2 Diagnóstico Radiológico**

O exame radiográfico do tórax constitui um relevante instrumento diagnóstico, uma vez que a tuberculose causa anormalidades radiográficas na maioria dos pacientes. Seu potencial em detectar um caso de doença ativa deve ser reconhecido, principalmente, quando existe a suspeita de erro ou atraso na liberação dos resultados de outros testes e/ou quando estes estão negativos.

Duas situações distintas devem ser consideradas: a tuberculose primária e a tuberculose pós-primária (ou secundária), pois estas se manifestam clínica e radiologicamente de diferentes formas. A tuberculose pós-primária é, praticamente, exclusiva do adulto, tendo localização preferencial pelos segmentos dorsais dos lobos superiores e pelos segmentos apicais dos lobos inferiores. Quanto maior a extensão da doença maior a chance do paciente apresentar doença cavitária, caracterizada pela presença de um espaço de, pelo menos, 1 cm de diâmetro, transparente, contendo ar no parênquima pulmonar, circundado por um infiltrado ou parede fibrótica de espessura maior que 1mm (DUNLAP et al., 2000).

Nas situações em que as apresentações radiográficas são consideradas atípicas (alguns casos de tuberculose extrapulmonar ou TB/HIV), a tomografia computadorizada do tórax contribui para demonstrar alterações não visualizadas através da radiografia (PALACI et al. 2007).

Embora o exame radiográfico de tórax seja de suma importância, o método possui um fator limitante, já que várias doenças pulmonares produzem lesões semelhantes à TB. Dessa forma, o exame radiográfico de tórax não confirma nem descarta o diagnóstico, apenas indica a extensão da doença. (GARAY, 2004).

### **1.3.3 Diagnóstico Microbiológico**

O diagnóstico da TB só pode ser confirmado através da demonstração da presença do agente etiológico no espécime clínico por meio do exame microscópico, ou baciloscopia, e/ou cultura, ou ainda por meio de seqüências específicas de seu DNA através de técnicas moleculares.

#### **1.3.3.1 Microscopia**

O exame microscópico de esfregaço de espécimes clínicos, ou baciloscopia, constitui o método diagnóstico mais empregado nos serviços de saúde para a TB em função de sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Esse método consiste na visualização direta de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em esfregaços de espécimes clínicos, preparados e corados com metodologia padronizada e visualizados com o auxílio de um microscópio (WHO, 1998; BRASIL, 2001).

A detecção BAAR é a primeira evidência bacteriológica da presença de micobactérias no material clínico analisado. A baciloscopia fornece uma estimativa do número de bacilos eliminados pelo doente e é uma ferramenta importante no controle da transmissão da doença (WATTERSON & DROBNIEWSKI, 2000; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). As técnicas utilizadas para coloração do bacilo baseiam-se na capacidade de sua parede celular reter o corante, resistindo à descoloração com uma solução de ácido clorídrico em álcool, devido à grande concentração de ácidos micólicos em sua parede celular.

O método de Ziehl-Neelsen é o mais utilizado e, assim como o método de Kinyoun, utiliza a carbol-fucsina como corante específico. Essas técnicas devem ser visualizadas em objetiva de imersão, sendo necessário o exame mínimo de 300 campos microscópicos antes da pesquisa de BAAR ser considerada negativa (KENT & KUBICA, 1985). Métodos que utilizam corante fluorescente, como auramina-rodamina ou auramina O, permitem uma análise da área do esfregaço 4 a 10x maior que as técnicas à base de carbol-fucsina, pois a análise do esfregaço é realizada em um aumento de 250X a 450X, permitindo a observação de um número maior de

campos microscópicos (KENT & KUBICA, 1985; METCHOCK et al., 1999). Assim, a baciloscopia feita a partir de corantes fluorescentes é mais rápida que os métodos que utilizam o corante carbol - fucsina (BA & RIEDER, 1999; HANNA, 2004). Entretanto, essa técnica requer microscópio de fluorescência, um equipamento caro e não disponível na maioria dos laboratórios do país (BRASIL, 2004).

O Ministério da Saúde (2008) recomenda a análise semiquantitativa dos esfregaços de espécime clínico. Os critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia realizadas em espécimes clínicos estão descritos no **QUADRO 1**.

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

**QUADRO 1** – Critérios para Leitura e Interpretação dos Resultados da Baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen.

Fonte: Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, do Ministério da Saúde, 2008

A baciloscopia tem por objetivo fornecer um diagnóstico presuntivo de doença, rápida identificação dos casos mais infecciosos, além de ser capaz do controle terapêutico dos pacientes em tratamento (KENT & KUBICA, 1985).

### 1.3.3.2 Cultura

O isolamento do *M. tuberculosis* através da cultura de espécimes clínicos é a metodologia que permite a confirmação do diagnóstico, sendo por isso considerado o padrão ouro para o diagnóstico de tuberculose (KENT & KUBICA, 1985). A cultura é capaz de detectar entre 10 e 100 bacilos viáveis por mililitro de secreção, sendo, portanto, mais sensível que a baciloscopia, além de permitir o isolamento da

micobactéria, necessário para a identificação da espécie e para o teste de sensibilidade às drogas (PALOMINO, 2005). A sensibilidade da cultura varia entre 80% e 85% (MORGAN et al., 1983; ROBERTS et al., 1983; STAGER et al., 1991), e sua especificidade é de 98% (SCHIRM et al., 1995).

O isolamento do bacilo requer cuidados específicos, visto que grande parte dos espécimes analisados contém outros microrganismos além das micobactérias. A desproporção entre a velocidade de crescimento das micobactérias e das outras bactérias torna necessária uma descontaminação prévia de espécimes clínicos contendo flora associada, que, quando presente, pode impedir a multiplicação dos bacilos (BUIJTELS & PETIT, 2005). Além deste procedimento, algumas amostras, como o escarro, devem ser tratadas com um agente mucolítico, para liquefazer os restos orgânicos e liberar os bacilos intracelulares e em seguida devem ser concentrados por centrifugação. Espécimes clínicos provenientes de locais normalmente estéreis devem ser concentrados e inoculados diretamente no meio de cultura. (KENT & KUBICA, 1985).

Para a realização deste procedimento é necessária a utilização de meios de cultura específicos, como os meios sólidos, Lowenstein – Jensen e Ogawa, à base de ovo, e Middlebrook 7H10 e 7H11, à base de ágar, além ainda, dos meios líquidos, Middlebrook 7H9 e 7H12. Contudo, o tempo de detecção por essa técnica é superior ao da baciloscopia, podendo chegar de 2 a 8 semanas conforme o meio utilizado (FURIN & JOHNSON, 2005).

A utilização de equipamentos automatizados, como BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson, EUA), é uma alternativa para o isolamento e cultivo de micobactérias, pois estes possibilitam um diagnóstico mais precoce, com detecção do bacilo entre 7 a 21 dias (TORTOLI et al., 1999). No entanto, o custo elevado não permite a utilização dos mesmos pela grande maioria dos serviços de saúde.

### 1.3.3.3 Identificação do *M. tuberculosis*

#### Identificação Fenotípica do *M. tuberculosis*

Após o isolamento micobacteriano nos meios de cultura, é necessária a identificação dos organismos e posterior diferenciação entre o Complexo *M. tuberculosis* e micobactérias não causadoras de tuberculose (NTM, do termo inglês *non-tuberculosis mycobacteria*) (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000).

Os métodos convencionais de identificação das micobactérias baseiam-se nos aspectos fenotípicos, como caracterização morfológica, bioquímica e crescimento em presença de agentes inibidores. Uma identificação presuntiva pode ser feita através da observação da temperatura e tempo de crescimento, da morfologia das colônias e da produção de pigmentos. O crescimento do *M. tuberculosis* (MTB) em meio à base de ovo é lento, sendo que a visualização de colônias ocorre em torno de 21 dias. As colônias são rugosas, opacas e de cor bege. Não ocorre produção de pigmentos, mesmo após exposição à luz (METCHOCK et al., 1999).

Provas bioquímicas, como a de nitratoreductase e niacina, auxiliam na identificação do *M. tuberculosis* (**TABELA 1**). O teste para a detecção da niacina é o mais utilizado, juntamente com o teste de detecção da nitratoreductase e da produção de catalase, pois esses testes conseguem distinguir o *M. tuberculosis* não somente das demais micobactérias, como das outras espécies pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (WAYNE & DOUBEK, 1968). Além disso, o emprego de meios contendo agentes inibidores para a identificação das diferentes espécies micobacterianas é freqüentemente utilizado pela sua eficiência e baixo custo. O crescimento de bactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* é inibido em meios contendo 500 µg/mL de ácido p-nitrobenzóico (PNB), o que não ocorre com outras micobactérias. A distinção entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* pode ser feita através do uso de meios contendo 5µg/ml de hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH), onde ocorre a inibição do crescimento do *M. bovis* (GIAMPAGLIA et al., 2005). Apesar de amplamente utilizados devido ao seu baixo custo, esses métodos são demorados, pois exigem o isolamento bacteriano em meio sólido, o que pode

demorar entre 4 a 8 semanas (WOODS, 2002). O sistema BACTEC MGIT960 pode ser uma alternativa mais rápida para identificar as micobactérias, desde que seja adicionado PNB ao meio Middlebrook 7H9 (GIAMPAGLIA et al., 2007).

**TABELA 1: DIFERENCIAÇÃO ENTRE O COMPLEXO M. TUBERCULOSIS E MICOBACTÉRIAS NÃO CAUSADORAS DE TUBERCULOSE (NTM)**

Identificação	Suscetibilidade			Atividade de nitratoreductase	Produção de pigmento	Niacina
	PNB	TCH	NAP			
Complexo <i>M. tuberculosis</i> :						
<i>M. tuberculosis</i>	Sensível	Resistente	Sensível	Positiva	Ausente	Positiva
<i>M. bovis</i>	Sensível	Sensível	Sensível	Negativa	Ausente	Negativa
<i>M. africanum</i>	Sensível	Variável	Sensível	Negativa	Ausente	Negativa
NTM	Resistente	Resistente	Resistente	Variável	Variável	Negativa (maioria)

### Identificação Molecular do *M. tuberculosis*

Técnicas de biologia molecular para detecção e identificação de micobactérias em meios de cultura têm sido aplicadas nos últimos anos, sobretudo em países desenvolvidos, com o intuito de reduzir o tempo do diagnóstico das doenças causadas por estes microrganismos. Dentre os métodos utilizados, encontra-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *in house*, com adaptações para uso no próprio laboratório, e os métodos comerciais baseados na PCR ou na hibridação de ácidos nucleicos. O principal método comercial designado AccuProbe® System (AccuProbe® *M. tuberculosis* Complex Culture Identification Test, Gen-Probe, CA, EUA) utiliza uma sonda de DNA marcada, complementar a um fragmento do RNA ribossômico específico de micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*. Este método apresenta sensibilidade e especificidade elevadas (BADAK et al., 1999), porém, requer uma quantidade mínima de 10<sup>5</sup> microrganismos (AMERICAN



THORACIC SOCIETY, 2000; HALE et al., 2001;), não pode ser utilizado em culturas mistas, além do seu custo financeiro ser relativamente elevado (TANG & PERSING, 1999; WOODS, 2002; DOWDY et al., 2003; BRASIL, 2004).

Além dos métodos de hibridação de ácidos nucléicos, foi lançada recentemente no mercado uma série de produtos baseados na tecnologia de DNA - STRIP® (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha) capazes de realizar diferenciação de micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* diretamente em espécimes clínicos ou culturas isoladas, além de realizar provas de resistência a drogas do tratamento. Este método apresenta elevada sensibilidade e especificidade, além de rapidez e alta relação custo efetividade.

#### **1.3.4 Métodos Complementares para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar**

O diagnóstico da TB também pode ser auxiliado por técnicas que complementam o diagnóstico clínico e microbiológico, como a prova tuberculínica (teste de Mantoux), e testes *in vitro* que se baseiam na produção de interferon – gama (INF –  $\gamma$ ), como o QuantiFERON – TB Gold ELISA e o ensaio T – SPOT TB (ELISPOT).

A prova tuberculínica envolve a avaliação da imunidade celular ativada por antígenos específicos do MTB, sendo exibida após o desenvolvimento de uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia no período de 48 a 72 horas após o inóculo do antígeno intradérmico. A reação a tuberculina se desenvolve entre 3 semanas a 3 meses após o contato com o bacilo (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). O teste de Mantoux é o principal teste cutâneo utilizado em todo o mundo, embora diferentes preparações de antígenos estejam disponíveis, como RT23 e PPD, que podem possuir diferenças quanto seu desempenho (WANG et al., 2002).

O teste cutâneo avalia a reatividade das células T contra antígenos micobacterianos, sendo assim, não é capaz de distinguir entre a tuberculose "infecção sem doença" e infecção tuberculosa clinicamente ativa. Porém, é importante para o tratamento preventivo de pacientes que foram expostos ao bacilo, mas não possuem

a doença ativa, além de auxiliar no diagnóstico de pacientes com TB ativa (ANDERSEN, 2007).

O QuantiFERON-TB Gold ELISA (Cellestis, Victoria, Austrália), bem como o ensaio T-SPOT TB (ELISPOT) (Oxford Immunotec, Abingdon, UK) utilizam os antígenos ESAT-6 e CFP-10, respectivamente, que são escassos na BCG e comuns em micobactérias ambientais, como *M. avium*. Esses antígenos são mais específicos do que os testes cutâneos, ou sofrem menos com a interferência do status da vacina de BCG. Como acontecem com os testes cutâneos, os testes *in vitro* também não são capazes de distinguir TB ativa de infecção latente, porém, possuem vantagens operacionais, pois o retorno do paciente para a leitura do teste não é necessária. O CDC recomenda a utilização do QuantiFERON - TB Gold em todas as circunstâncias em que o teste cutâneo é atualmente utilizado (CDC, 2005).

*Revisão de Literatura*

---

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Considerações Gerais

O diagnóstico é fundamental para prevenção da tuberculose e para a obtenção de menores taxas de morbi/mortalidade e de seqüelas pulmonares. No Brasil e na maioria dos países em desenvolvimento, o diagnóstico laboratorial é baseado apenas na baciloscopia. Este exame apresenta boa especificidade em áreas de alta taxa de prevalência, porém sua sensibilidade é limitada, pois a presença de bacilos só é detectada se estes estiverem em grande número na amostra examinada (TOMAN, 1980). Na atual situação epidemiológica mundial a sensibilidade do exame de baciloscopia situa-se na faixa de 40 a 85% (WILKINSON & STURM, 1997; HABEENZU et al., 1998; PERERA & ARACHCHI, 1999). O diagnóstico do restante dos casos só é possível mediante a utilização de métodos mais caros e ou laboriosos como o sistema automatizado de cultura e de amplificação de ácidos nucléicos do *M. tuberculosis*.

A baciloscopia é considerada bastante sensível para a detecção de pacientes com doença cavitária, porém pouco sensível para o diagnóstico de pacientes paucibacilíferos, em particular aqueles pacientes oligossintomáticos, sobretudo em estágio inicial da doença (BRODIE & SCHLUGER, 2005).

Para que o paciente seja diagnosticado através da baciloscopia, é necessário que haja uma carga bacilar de 5000 a 10000 bacilos/ml de espécime clínico, abaixo desta concentração, as chances de detectar a micobactéria são reduzidas (DAVID, 1976), conforme descrito no **QUADRO 2**:

NÚMERO DE BACIOS OBSERVADOS	CONCENTRAÇÃO ESTIMADA DE BACIOS POR ML DE ESCARRO	PROBABILIDADE DE UM RESULTADO POSITIVO
0 em 100 ou mais campos	Menos do que 1000	Menos do que 10%
1 – 2 em 300 campos	5000 – 10000	50%
1 – 9 em 100 campos	Aproximadamente 30000	80%
1 – 9 em 10 campos	Aproximadamente 50000	90%
1 – 9 por campos	Aproximadamente 100000	96,2%
10 ou mais por campo	Aproximadamente 500000	99,95%

**QUADRO 2** - Número de BAAR observados nas baciloscopias, concentrações de bacilos cultiváveis nos escarros e probabilidade de resultados positivos – Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, do Ministério da Saúde, 2008.

Além disto, a acurácia do exame microscópico depende de outros fatores, tais como: (i) experiência do técnico microscopista, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO/IUATLD, 2000), a experiência em anos do microscopista aumenta significativamente a sensibilidade da baciloscopia; (ii) qualidade da amostra, uma boa amostra de escarro é a que provém da árvore brônquica, obtida após esforço de tosse (expectoração espontânea) e não a que se obtém da faringe ou por aspiração de secreções nasais e nem tampouco a que contém somente saliva (BRASIL, 2008); e (iii) volume da amostra de escarro, segundo Warren e colaboradores (2000), para se obter resultados de baciloscopias reprodutíveis é necessário um volume mínimo de 5 ml de escarro.

## 2.2 Métodos Utilizados para o Exame de Baciloscopia

Segundo o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias do Ministério da Saúde (2008), são descritos dois métodos de execução do esfregaço: o método da baciloscopia direta e o método da baciloscopia com concentração do espécime clínico. Além desses, existem métodos alternativos para a concentração do espécime clínico, como a sedimentação, a flotação e filtração (CONTIJO FILHO & FONSECA, 1979; SMITHWICK & STRATIGOS, 1981; VASANTHAKUMARI, 1988).

### **2.2.1 Método Esfregaço Direto de Escarro**

O método de preparação de esfregaço direto utiliza escarro sem tratamento prévio e é indicado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico laboratorial de todos sintomáticos respiratórios (BRASIL, 2008). A baciloscopia direta é realizada a partir de escarros espontâneos utilizando a porção mais purulenta, que é colocada e distendida diretamente sobre a lâmina. As secreções por suas características físicas, também podem ser distendidas diretamente sobre a lâmina (BRASIL, 2008). Apesar de esta técnica ser de fácil execução, baixo custo e apresentar uma alta especificidade em áreas de alta prevalência da doença, ela possui uma baixa sensibilidade. Independente da coloração, a base de fucsina o método direto de baciloscopia apresenta uma sensibilidade entre 8,8% a 80,0% em relação aos casos verificados em cultura (NAGANATHAN et al., 1979; ABER et al., 1980; PETERSON et al., 1999). Outros estudos reforçam ainda que a sensibilidade da baciloscopia em esfregaço direto raramente ultrapassa 65% (VASANTHAKUMARI, 1988; ALLWOOD et al., 1997; APERS et al., 2003), seja utilizando-se a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen ou de auramina com observação em microscópio de fluorescência (GITHUI et al., 1993).

### **2.2.2 Método de Digestão e Centrifugação de Escarro**

Com o intuito de aumentar a sensibilidade da baciloscopia, Kent & Kubica em 1985, realizaram um estudo com amostras digeridas com agentes mucolíticos e observaram que o procedimento adequado para a concentração por centrifugação era uma força centrífuga relativa de 3000g durante 15 minutos a uma temperatura de 8 a 10°C. Nestas condições obtiveram uma taxa de sedimentação de 95% das micobactérias presentes em amostras de escarro.

Com base nos resultados deste estudo, o NALC/NaOH passou a ser utilizado como o principal agente monolítico nas técnicas de digestão de amostras de escarro. De acordo com e Perkins (2000) Farnia e colaboradores (2002), os esfregaços preparados após a utilização desta metodologia e corados pela técnica de Ziehl

Neelsen apresentaram uma acurácia de aproximadamente 66 a 83% quando comparadas à cultura.

Além disso, estudos realizados posteriormente confirmaram que a inclusão da etapa de concentração por centrifugação à baciloscopia, corados à base de fucsina, incrementa em 6 a 23% a sensibilidade do método em relação ao método de esfregaço direto (BRUCHFELD et al., 2000; GARAY, 2000).

Além do NALC, outros agentes mucolíticos têm sido utilizados na tentativa de aumentar a acurácia do exame microscópico de escarro.

Diversos pesquisadores descrevem a utilização do hipoclorito de sódio, principalmente nos países em desenvolvimento e com altas prevalências de TB, para a realização da digestão e descontaminação de amostras de escarro, (WILKINSON & STURM, 1997; HABEENZU et al., 1998).

Segundo Gebre e colaboradores (1995), a utilização do hipoclorito de sódio como agente digestor de espécimes de escarro, seguida de centrifugação, incrementa a sensibilidade da baciloscopia em 38,4% em relação ao esfregaço direto.

O aumento na acurácia da baciloscopia após digestão do espécime de escarro com NaOCl é atribuído a eliminação de debris, deixando campo microscópico limpo (MIÖRNER et al., 1996).

Além do NALC e do hipoclorito de sódio, outro agente mucolítico que emprega o detergente C<sub>18</sub> – carboxipropilbetaína, também pode ser utilizado como agente fluidificante de espécimes de escarro (MANTEROLA et al., 2003; LASERSON et al., 2004). Estudos que utilizaram a digestão de espécimes de escarro com o C<sub>18</sub> – carboxipropilbetaína obtiveram resultados contrastantes, de acordo com Manterola e colaboradores (2003) e Padilla e colaboradores (2005), apesar de terem obtido uma diminuição na sensibilidade da baciloscopia, entre 2,6% a 19,4%, em relação ao método tradicional, obtiveram um aumento na positividade de culturas de espécimes com resultados de baciloscopia negativas após digestão e descontaminação pelo detergente.

### **2.2.3 Método de Sedimentação**

A utilização de centrífugas de rotor selado para a concentração de espécimes clínicos no diagnóstico da TB é limitada, principalmente em países com escassos recursos financeiros, já que esta possui um alto valor comercial, além de necessitar de energia elétrica para sua utilização. (GEBRE et al., 1995; WILKINSON & STURM, 1997).

Compelidos por este fato, Oliver & Reusser em 1942, desenvolveram um método baseado no processo de sedimentação da amostra após a digestão com hipoclorito de sódio para a realização de esfregaços microscópicos. Garay (2000) e Vasanthakumari (1988), utilizando este método, observaram um incremento médio de 9 a 23%, conforme o tempo de sedimentação em relação ao esfregaço direto.

### **2.2.4 Método de Filtração**

Smithwick & Stratigos, imbuídos em aumentar a acuracia da baciloscopia, desenvolveram, em 1981, uma técnica de filtração para a concentração de amostras de escarro em membrana de policarbonato (SFP) para análise microscópica. A técnica desenvolvida consiste na digestão do espécime de escarro com NaOCl, seguido da adição de etanol 95%, e passagem da mistura por uma membrana de policarbonato de 25 mm de diâmetro com poros de 1,0 µm, sob pressão negativa.

Utilizando esta metodologia em amostras de escarro de pacientes suspeitos de tuberculose, Smithwick & Stratigos (1981), obtiveram um incremento de 24,4% na sensibilidade em relação ao esfregaço direto e de 18,0% em relação aos esfregaços preparados após digestão e descontaminação por NALC - NaOH.

Após um período de vinte anos, Birnbaum & Fennelly (2003), propuseram-se a aperfeiçoar o método de filtração sob a supervisão do Dr. Heifets no Laboratório de Micobacteriologia Clínica do National Jewish Medical and Research Center, Denver, CO, EUA. Estes pesquisadores deduziram que a redução da área efetiva de filtração, poderia levar a uma maior concentração de bacilos por campo microscópico (BIRNBAUM & FENNELLY, 2003). Com isso, utilizaram suportes em



inox de 13 mm de diâmetro, em relação aos de 25 mm utilizados por Smithwick & Stratigos. Após a realização de alguns estudos pilotos verificaram que o melhor método para limitar a área efetiva de filtração era através da compressão do SFP entre dois discos de Teflon® fabricados sob medida, com 5 mm de diâmetro interno (BIRNBAUM & FENNELLY, 2003). Além disso, decidiram reduzir o tamanho dos poros da membrana de 1,0 µm para 0,4 µm, para melhorar a eficiência de retenção dos bacilos na membrana.

Para comprovar a maior eficiência de retenção de bactérias deste sistema, Birnbaum & Fennelly (2003) prepararam suspensões de *M. smegmatis* ( $10^5$  CFU/ mL) e as filtraram em membranas com diferentes diâmetros, 13mm e 25mm. Em quatro experimentos independentes constataram um aumento significativo no número de bacilos no método modificado em relação aos SFP's realizados por Smithwick & Stratigos em 1981. Notaram ainda que o método modificado de filtração detectou 4,5 vezes mais bacilos que o SFP de 25 mm.

### **2.3 Antecedentes e Justificativa do Projeto**

Diante dos resultados promissores obtidos em modelo experimental com o sistema de filtração modificado para concentração de bacilos, o Dr. Fennelly da Universidade de Medicina e Odontologia de Nova Jersey – EUA propôs ao NDI-UFES uma colaboração para avaliar este sistema através de um ensaio clínico fase II. Para viabilizar esta proposta, os pesquisadores submeteram um projeto a Organização Mundial de Saúde e obtiveram em 2005 a aprovação (WHO-TDR ID no A30499) para o desenvolvimento do mesmo.

Antes de iniciar o projeto, porém, os pesquisadores se depararam com alguns problemas técnicos. Indagaram inicialmente se o simples processo de divisão da amostra de escarro poderia interferir nos resultados do estudo. Ensaio clínico para avaliação de novos métodos diagnósticos e terapêuticos, muitas vezes realizam a divisão de amostras para análise comparativa entre o novo teste e o método padrão, supondo que a divisão ocorra de maneira equitativa, conservando a carga bacilar entre as partes. Como não havia estudos que comprovassem esta hipótese,

avaliaram a influência de dois procedimentos (químico e mecânico) na homogeneização e divisão de amostras de escarro com resultado prévio de baciloscopia positiva. Todos os espécimes foram divididos em duas alíquotas (I e II). Para a divisão de 27 das 55 amostras incluídas no estudo, utilizaram solução de N-acetil-L-cisteína (NALC 50mg/ml – 10% do volume da amostra por 15 minutos) enquanto que, para 28 amostras, utilizaram procedimento mecânico. Neste caso as amostras foram inicialmente homogeneizadas mecanicamente por agitação com pérolas de vidro e, após a divisão, cada alíquota foi digerida com NALC na mesma concentração. Em cada amostra foi realizada cultura quantitativa em meio de cultura Middlebrook 7H10 (determinação da UFC /ml). Para o procedimento que fez uso imediato do NALC, foi observada na alíquota I uma média de 5,66 ( $\pm$  0,92)  $\log_{10}$  UFC/ml, enquanto que na alíquota II 5,65 ( $\pm$  0,92)  $\log_{10}$  UFC/ml. No procedimento com pérolas de vidro, foi observada uma média de 5,53 ( $\pm$  0,91) e 5,43 ( $\pm$  0,94)  $\log_{10}$  UFC/ml em cada alíquota respectivamente. Quando aplicado o teste *t*, com 95% de certeza a estes resultados, não foram observadas diferenças significativas entre os métodos. Demonstrando assim, que os procedimentos químicos e físicos são igualmente eficientes para homogeneização e divisão de amostras de escarro. (Estes dados fazem parte de um manuscrito que se encontra em fase de redação).

Protótipos de equipamentos, kits e sistemas diagnósticos requerem processos contínuos de ajustes e de muita paciência para obter as condições ideais de funcionamento e padronização. Diante deste fato inofismável, os pesquisadores dedicaram-se então, ao aprimoramento e estabelecimento das condições operacionais para uso do modelo desenvolvido em rotina laboratorial. Os resultados deste trabalho desenvolvido ao longo de três anos serão apresentados a seguir como parte desta dissertação mestrado.

Diante do exposto na revisão de literatura deste capítulo, não pairam dúvidas que apesar dos avanços científicos e tecnológicos, a baciloscopia de escarro continua sendo o principal exame para o diagnóstico da tuberculose pulmonar em razão de sua simplicidade, rapidez e baixo custo financeiro.

Todavia, em razão de sua baixa sensibilidade e da impossibilidade de aplicação imediata em laboratórios de saúde pública de métodos modernos e mais sensíveis (moleculares e a cultura automatizada), por serem mais laboriosos, demorados ou

caros, julgamos absolutamente necessário o desenvolvimento e ou aprimoramento do exame microscópico de escarro para o diagnóstico da tuberculose.

*Objetivo*

---

### **3 Objetivo**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Padronizar e avaliar a acurácia do exame de baciloscopia em membrana de policarbonato após concentração de amostras de escarro por filtração (Sistema BacFil), para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- 1 Padronizar os componentes, soluções e condições operacionais do Sistema BacFil;
- 2 Avaliar a acurácia do Sistema BacFil, para o diagnóstico da tuberculose pulmonar;
- 3 Comparar a acurácia do Sistema BacFil em relação ao exame microscópico direto e concentrado por centrifugação;
- 4 Avaliar a acurácia das técnicas de coloração de Auramina O e de Kinyoun para o exame de baciloscopia em membrana de policarbonato após concentração de amostras de escarro pelo Sistema BacFil;
- 5 Avaliar a contribuição da segunda amostra de escarro nos exames microscópicos direto, após centrifugação e após filtração para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

# *Material e Métodos*

---

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Modelo de Estudo**

O estudo foi caracterizado como observacional transversal, comparativo de diferentes métodos para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar. Um modelo de múltiplos estágios foi utilizado para facilitar a análise estatística.

### **4.2 Padronização do Sistema de Filtração**

Para otimizar o desempenho do Sistema BacFil, tendo em vista ser este, ainda, um protótipo de sistema de filtração, foram avaliados os seguintes componentes em cinco experimentos independentes: pressão, tamanho de poro de membrana, anel limitador de área de filtração e as soluções utilizadas no processamento e filtração das amostras. Foi avaliado também o tempo do processo de filtração em rápido (<20 minutos) ou lento (>20 minutos).

*Análise de Pressão* – Para determinar a força que deveria ser imposta ao sistema, para que a amostra pudesse atravessar a membrana sem que houvesse rompimento da mesma, foram avaliadas diferentes pressões (5, 10 e 20 mmHg) com o auxílio de um manômetro acoplado a uma bomba de vácuo manual.

*Análise do tamanho do poro da membrana* – Membranas com tamanhos de poro de 0,4 µm, 0,8 µm e 1,0 µm foram testadas com a finalidade de favorecer o melhor fluxo e concentração de espécimes sobre sua superfície sem que as mesmas se rompessem.

*Análise da utilização de anel limitador* – a utilização de um anel de teflon, que reduz exponencialmente a área de filtração, também foi avaliada com o intuito de aumentar a concentração do espécime clínico sobre a superfície da membrana sem que a mesma se rompesse.

*Análise da solução de NALC* – A solução de NALC, utilizada como agente mucolítico, foi avaliada nas concentrações de 5 e 50 mg/ml após a adição ao espécime clínico na proporção volume/volume e 10% do volume, respectivamente.

*Análise da solução de hipoclorito de sódio* – O NaOCl, utilizado como agente mucolítico e descontaminante, foi avaliado nas concentrações de 5% e 10% adicionado em um volume referente a duas vezes o volume da amostra.

*Análise da solução de etanol/Triton* – A utilização da solução de etanol/Triton 1%, com volume referente a uma vez o volume da mistura de amostra de escarro e NaOCl foi avaliada com a intenção de aumentar o fluxo da amostra através da membrana.

### **4.3 Caracterização das Amostras**

No período de outubro de 2005 a outubro de 2008, foram elegíveis para participar do estudo, pacientes de ambos os sexos com idade entre 18 a 82 anos, com suspeita clínica e radiográfica de tuberculose pulmonar e capacidade de produzir escarro, atendidos no Ambulatório de Tisiologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, em Vitória e nas Unidades Básicas de Saúde dos municípios da Grande Vitória. Os pacientes foram arrolados após as avaliações de triagem e a confirmação da elegibilidade.

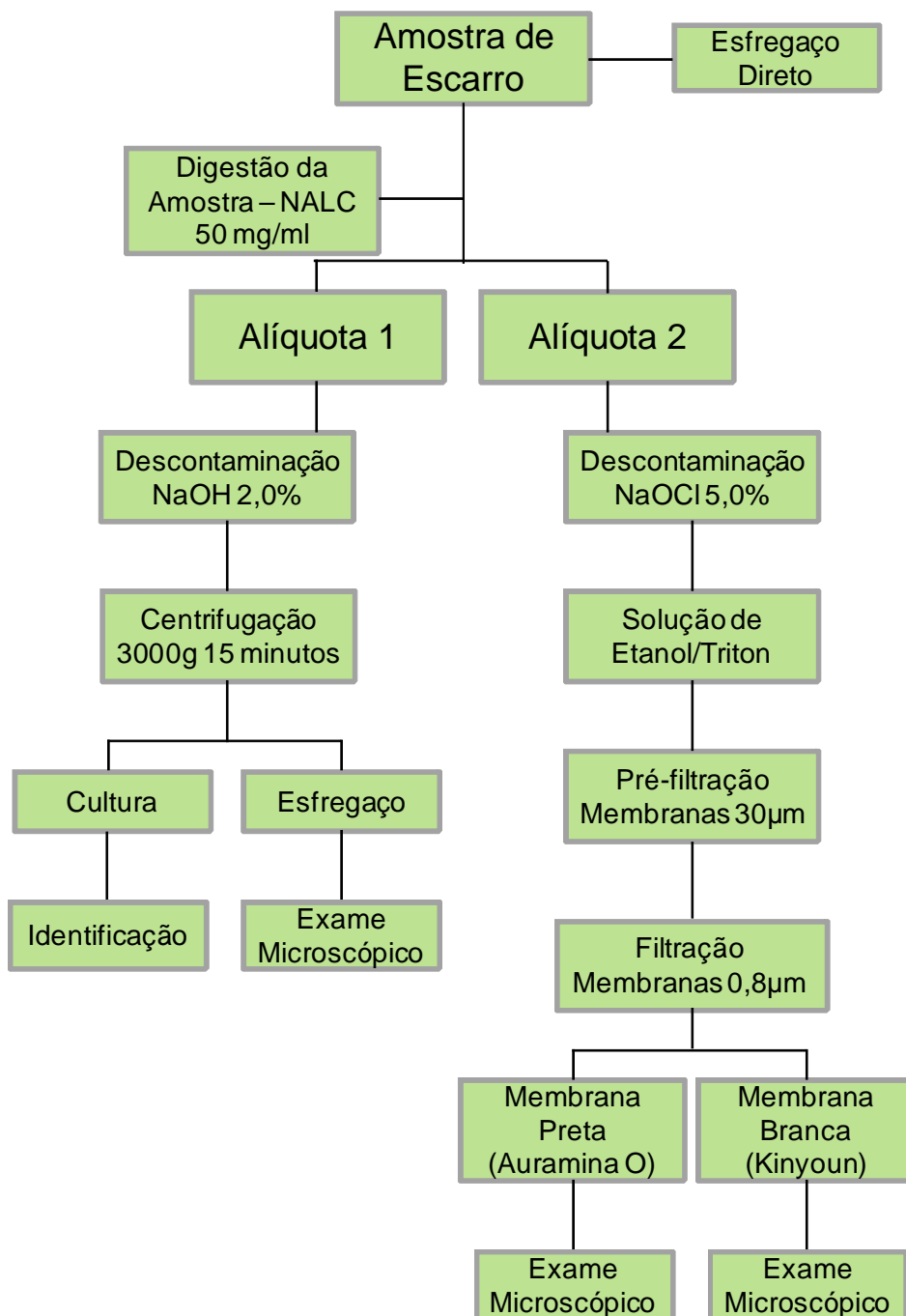
### **4.4 Coleta das Amostras**

Um total de 450 amostras de escarro espontâneo de 331 pacientes selecionados foi coletado para a realização do estudo. Os pacientes foram orientados a coletar duas amostras, de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde (2008). Os escarros foram coletados em frascos com tampa de rosca estéreis, sob orientação da equipe de enfermagem, e mantidos entre 2 a 10°C até o seu processamento no laboratório.



#### 4.5 Exames Laboratoriais

Todos os procedimentos laboratoriais, descritos na **FIGURA 2**, foram realizados no laboratório de Micobactérias do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI/UFES), sob condições padrão de biossegurança.



**FIGURA 2** – Esquema de processamento de amostras.

#### **4.5.1 Esfregaço Direto**

Os esfregaços diretos foram preparados a partir da distensão da parte mais purulenta da amostra de escarro, com o auxílio de um palito estéril, sobre toda a área de uma lâmina para microscópio previamente limpa e identificada.

#### **4.5.2 Digestão das Amostras de Escarro**

As amostras de escarro foram transferidas para tubos de centrífuga de 50 ml, e submetidas à digestão com N-acetil-L-cisteína 50 mg/ml, diluído em uma solução de citrato de sódio com concentração final de 0,725% em um volume correspondente a 10% ao da amostra, sendo homogeneizadas em um agitador do tipo vórtex e em seguida mantida em temperatura ambiente por 15 minutos.

#### **4.5.3 Divisão das Amostras de Escarro**

Depois de digeridos, os espécimes foram divididos em duas alíquotas de mesmo volume, sendo uma destinada a realização de cultura e esfregaço e outra para realização do processo de filtração pelo Sistema BacFil.

#### **4.5.4 Descontaminação das Amostras para Realização de Cultura**

Uma alíquota da amostra digerida foi descontaminada pela adição de igual volume de uma solução de NaOH / citrato de sódio, com concentração final de 1,00% e 0,725% respectivamente, por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada uma solução de tampão fosfato 0,067 M pH 6,8 até um volume final de 50 ml para neutralizar a reação. As amostras foram centrifugadas a 3000g, por 15 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram ressuspensos em 2,0 ml do próprio sobrenadante.

#### **4.5.5 Descontaminação das Amostras para Realização de Filtração**

A segunda parte da amostra digerida foi descontaminada pela adição de NaOCl 5%, em um volume referente a duas vezes ao volume inicial da amostra, sendo homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 15 minutos, seguida de homogeneizações a cada 5 minutos. Para evitar a perda da atividade do cloro e, portanto, perda do seu poder de descontaminação, a solução de NaOCl 5% foi preparada no dia do experimento, filtrada em membranas de nitrocelulose (Millipore<sup>TM</sup> - Billerica, MA – EUA) de 25mm com poros de 0,2µm, para evitar resultados falso positivos e armazenada em frasco âmbar estéril até sua utilização.

Em seguida, foi adicionada uma solução de etanol 95%/Triton 1%, preparada e filtrada em membranas de nitrocelulose (Millipore<sup>TM</sup> - Billerica, MA – EUA) de 25mm com poros de 0,2 µm, referente ao mesmo volume da mistura de amostra digerida e solução de NaOCl. As misturas finais foram mantidas à temperatura ambiente até sua posterior filtração.

#### **4.5.6 Cultura em Meio Ogawa**

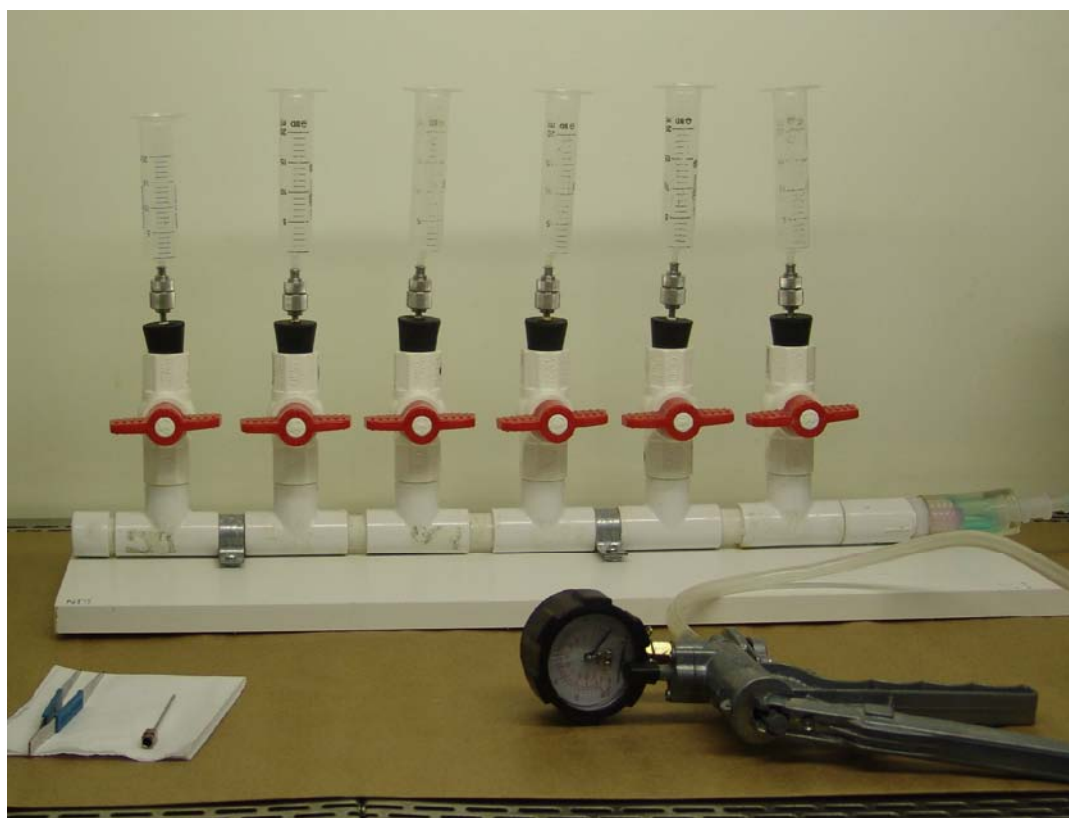
A cultura em meio sólido foi realizada inoculando-se um volume de 0,2 ml do sedimento das amostras processadas em um frasco contendo meio de cultura de Ogawa. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C e examinadas semanalmente para verificação de crescimento microbiano. Após 6 semanas de incubação, as culturas que não apresentaram crescimento de micobactérias foram consideradas negativas (KENT & KUBICA, 1985).

#### **4.5.7 Confecção dos Esfregaços Após Centrifugação**

Os esfregaços de escarro após a centrifugação da amostra foram confeccionados com 100 µl do sedimento das amostras processadas e colocados sobre lâminas de microscópio previamente limpas e identificadas.

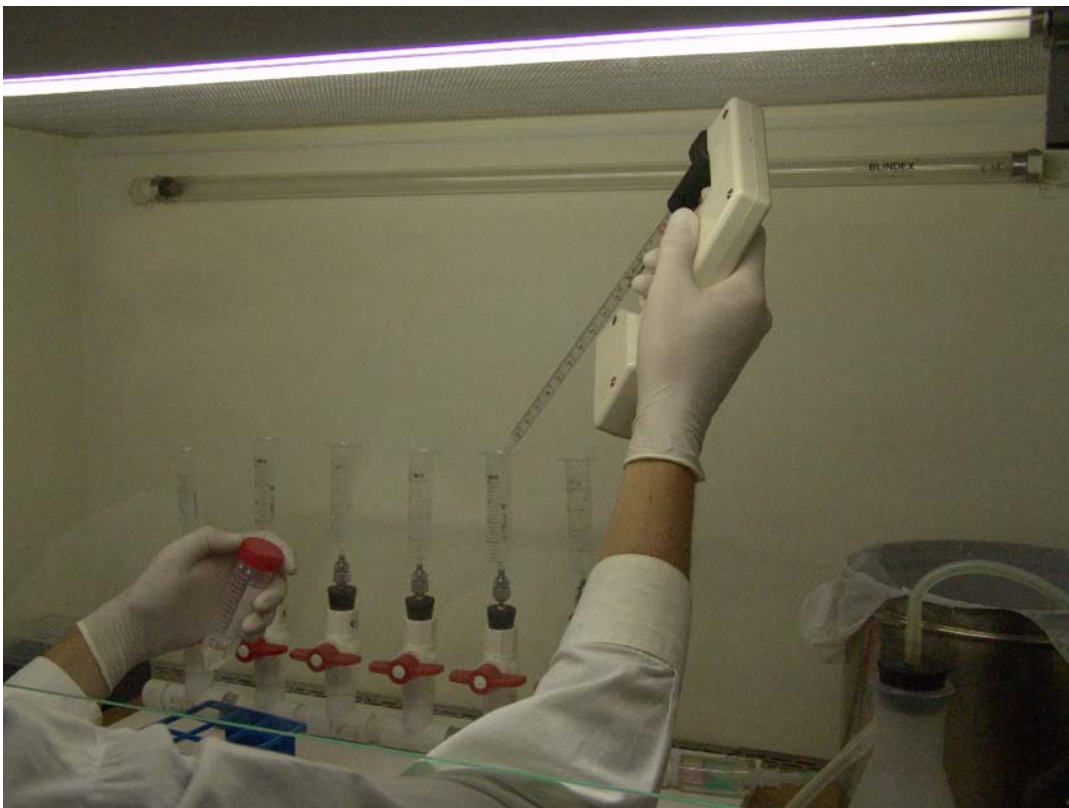
#### 4.5.8 Filtração das Amostras de Escarro

Após a descontaminação da alíquota de amostra destinada à filtração, a mesma foi pré-filtrada através de uma membrana de nitrocelulose (Millipore™ - Billerica, MA – EUA) de 25mm com poros de 30,0µm adaptada em um suporte de polipropileno, preparado previamente, com o auxílio de uma seringa de 20ml estéril. Após a realização desse procedimento, a mistura foi transferida para um novo tubo de 50ml estéril, para posterior realização da filtração. As amostras pré-filtradas foram, então, filtradas através de membranas de policarbonato brancas e pretas (Osmonics<sup>INC</sup> - Minnetonka, MN - EUA) de 13mm, com poros de 0,8µm, com seu lado brilhante voltado para cima e adaptadas em um suporte de aço inox (Millipore™ - Billerica, MA – EUA) previamente montado. Os suportes de aço inox foram previamente encaixados em um aparelho de PVC, com uma saída para uma bomba de vácuo manual (Mityvac® - St. Louis, MO - EUA), ligados através de um adaptador de borracha. **(FIGURA 3)**



**FIGURA 3** – Montagem do sistema de Filtração de amostras BacFil

Com o auxílio de um barril de seringa de 20 ml utilizado como reservatório, a amostra foi então filtrada, num volume máximo de 10 ml, utilizando uma bomba de vácuo manual para a aplicação de pressão negativa, evitando assim, a geração de aerossóis a uma pressão de 20mmHg. Após a passagem de todo o volume da amostra, o líquido foi desprezado em um depósito conectado ao aparelho de PVC e a membrana foi retirada do suporte de aço inox com a assistência de uma pinça (Millipore™ - Billerica, MA – EUA) e uma agulha de biópsia, e transferida com o seu lado brilhante. Portanto, o sedimento da amostra voltado para cima e fixada a uma lâmina de microscópio previamente identificada. **(FIGURA 4)**



**Figura 4** – Processo de filtração de espécimes de escarro utilizando o Sistema BacFil.

A cada experimento foram realizados controles positivo e negativo, para que assim se evitasse resultados falso-positivos e falso-negativos.

Após a retirada da membrana, o suporte de aço inox foi colocado em uma solução de Amphyl para descontaminação e posterior limpeza para reutilização, e o descarte destinado à descontaminação por autoclavação.

#### **4.5.9 Identificação dos Isolados de Micobactérias**

Para todas as culturas com crescimento de micobactérias em meio de Ogawa foi realizada uma análise fenotípica baseada nas seguintes características: aspecto morfológico, pigmentação, tempo de crescimento das colônias e inibição do Crescimento Bacteriano em Presença de Ácido *p*-nitrobenzóico (PNB) e Ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH).

Os isolados foram identificados como *M. tuberculosis* com base nas características fenotípicas das colônias (rugosas, cremes e opacas), na resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (5µg/ml) e na sensibilidade ao ácido *p*-nitrobenzóico (500µg/ml) (KENT & KUBICA, 1995; COLLINS et al., 1997).

#### **4.5.10 Coloração e Leitura dos Esfregaços Confeccionados**

Os esfregaços diretos e centrifugados, depois de fixados pelo calor, em uma chapa aquecida a 80°C por pelo menos 1 hora, foram corados pela técnica de Auramina O, assim como as membranas de policarbonato pretas. As membranas de policarbonato brancas foram coradas pela técnica de Kinyoun, que utiliza fucsina fenicada.

A análise semiquantitativa dos esfregaços corados pela técnica de Auramina O foi realizada em um microscópio Olympus BX40F-3 (Olympus Optical Company, Tóquio, Japão) e os esfregaços corados pela técnica de Kinyoun foram analisados em um microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon, Tóquio, Japão) de acordo com as recomendações do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias (2008).

Para os esfregaços que apresentaram resultado negativo após a leitura de 100 campos microscópicos, mais 200 campos microscópicos foram observados para a liberação do resultado.

Todos os esfregaços com resultados positivos e 10% dos esfregaços com resultados negativos foram re-analisados por outro técnico, sem que um tivesse acesso prévio ao resultado do outro. Após a finalização das leituras os resultados foram comparados.

#### **4.5.11 Estudo de Proficiência para a Leitura de Esfregaços**

Paralelamente ao estudo proposto, foi realizada proficiência dos técnicos participantes do estudo em baciloscopia para tuberculose com o objetivo de avaliar a concordância entre a leitura de esfregaços microscópicos para o diagnóstico de TB entre diferentes profissionais. Para isso, foram selecionadas 15 amostras com os resultados prévios de baciloscopia entre negativo, positivo (+), positivo (++) e positivo (+++).

Outro profissional não participante do estudo re-identificou as amostras supracitadas com números de 1 – 15 e confeccionou esfregaços em triplicata de cada uma das amostras sem que os técnicos que participariam do estudo tivessem acesso ao resultado prévio da baciloscopia e, tampouco, ao resultado da leitura do outro. As lâminas foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen e as leituras foram realizadas de acordo com as recomendações do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias (2008).

Os resultados das leituras foram armazenados em planilhas individuais e, somente ao término da leitura das baciloscopias, os resultados foram confrontados.

#### **4.6 Análise Estatística**

Os dados recolhidos inicialmente na forma de formulários deram origem a um banco de dados do programa Microsoft Windows Excel. Posteriormente, esses dados foram tabulados em uma tabela 2x2, que continha os resultados dos métodos de baciloscopia realizados nesse estudo e os resultados das respectivas culturas (padrão ouro).

A acurácia dos métodos de baciloscopia foi determinada sempre pela análise da primeira amostra de cada paciente com resultado de cultura finalizada como negativa ou positiva.

Os valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos métodos realizados no estudo foram determinados através da análise dos resultados comparados à cultura com o auxílio do programa MedCalc (versão 9.3.9.0). A concordância entre os métodos de baciloscopia em relação ao padrão ouro foi realizada através do índice Kappa.

O índice Kappa foi utilizado para medir a concordância entre análise microscópica de esfregaços por diferentes leitores em relação à leitura padrão do laboratório de micobacteriologia.

O Índice Kappa varia de 0 a 1, onde 0 indica que os resultados acontecem totalmente ao acaso e 1 indica concordância perfeita. Os resultados obtidos foram, então, interpretados conforme a escala de valores mostrada na **TABELA 2**.



**TABELA 2 – ESCALA DE CONCORDÂNCIA KAPPA.**

Índice Kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Não Boa
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Fonte: Pereira, 2002.

#### **4.7 Comissão de Ética**

Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados com o protocolo 10/04 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória, ES, juntamente com o Termo de Consentimento que deverá ser assinado pelos pacientes participantes.

##### **4.7.1 Termo de Consentimento**

Cada voluntário do estudo recebeu um termo de consentimento após informação. O termo de consentimento foi lido por um membro da equipe do estudo quando os voluntários não sabiam ler. Um aconselhamento apropriado para todos os indivíduos do estudo, antes e após o teste de HIV, foi realizado por uma equipe treinada. Os indivíduos tiveram oportunidade de esclarecer dúvidas e levantar qualquer dúvida sobre o estudo com a equipe. O termo de consentimento foi assinado pelo paciente, pelo investigador e por um membro da equipe, se o paciente fosse analfabeto. Uma cópia do termo de consentimento foi entregue a cada um dos pacientes.

*Resultados*

---

## **5 Resultados**

Para avaliar o sistema BacFil e a sua capacidade de detectar BAAR a partir de esfregaços produzidos após a filtração de espécimes de escarro, através de membranas de policarbonato, realizou-se os ensaios do estudo em duas etapas. A primeira etapa consistiu da análise experimental do desempenho de diversos componentes que formam o sistema, além das soluções utilizadas no processamento das amostras para que fosse montado o melhor conjunto de filtração, e a segunda etapa, da análise do desempenho do sistema BacFil na detecção de BAAR em relação aos métodos tradicionais de esfregaços.

### **5.1 Padronização do Sistema de Filtração**

#### **5.1.1 Avaliação do Desempenho dos Componentes do Sistema BacFil**

A avaliação do desempenho dos diferentes componentes utilizados no sistema BacFil está descrita na **TABELA 3**. Realizou-se uma análise qualitativa das diferentes pressões a que o sistema foi submetido, além dos diferentes tamanhos de poros de membrana e a presença ou ausência de anel de teflon no sistema, para a limitação da área de filtração. A análise foi realizada observando-se a influência de cada componente no processo de filtração, assim como o tempo médio necessário para a passagem da amostra através da membrana.

Verificou-se que as membranas com tamanho de poros de 0,4  $\mu\text{m}$  ou com a presença de anel de teflon, quando submetidas às pressões de 5, 10 e 20 mmHg, romperam. Entretanto, as membranas com poros  $\geq 0,8 \mu\text{m}$  na ausência de anel de teflon submetidas as pressões de 5, 10 e 20 mmHg não romperam. A pressão de 5 mmHg não foi suficiente para que a amostra atravessasse a membrana, por outro lado, as pressões de 10 e 20 mmHg foram suficientes para a filtração dos espécimes, levando menos tempo quando o sistema foi submetido a uma pressão de 20 mmHg. Em relação aos tamanhos de poro de membrana, não observou-se

diferenças no tempo médio necessário à passagem do espécime clínico através da membrana.

**TABELA 3 – ANÁLISE QUALITATIVA DO DESEMPENHO DOS COMPONENTES UTILIZADOS NO SISTEMA BACFIL.**

Ajustes:	Ruptura de Membrana <sup>a</sup>	Passagem pela Membrana <sup>a</sup>	Tempo de Filtração <sup>b</sup>
Pressão:			
05 mmHg	Não	Não	Não se aplica
10 mmHg	Não	Sim	Lento
20 mmHg	Não	Sim	Rápido
Tamanho de poro da membrana:			
0,4 µm	Sim	Não se aplica	Não se aplica
0,8 µm	Não	Sim	Rápido
1,0 µm	Não	Sim	Rápido
Anel de teflon:			
Presença	Sim	Não se aplica	Não se aplica
Ausência	Não	Sim	Rápido

a – Sim ou Não

b – Rápido (< 20 minutos); Lento (> 20 minutos)

### 5.1.2 Avaliação do Desempenho das Soluções Utilizados no Sistema BacFil

Além da avaliação dos componentes, o desempenho das soluções também foi analisado qualitativamente e estão descritos na **TABELA 4**. Foram testadas diferentes concentrações de NALC 50 mg/ml (volume correspondente a 10% do volume da amostra ou volume/volume), Hipoclorito de sódio com concentração de 5% e 10% e utilização ou não da mistura de etanol/Triton 1%. A análise foi realizada

observando-se a capacidade de cada uma das soluções digerirem os espécimes de escarro, o tempo médio para a filtração dos espécimes e a detecção de BAAR pelo exame microscópico.

Todos os agentes mucolíticos, com exceção das amostras digeridas sem a utilização da solução de mistura etanol/triton, foram suficientes para digerir os espécimes e favoreceram a filtração pelo sistema. O processo de filtração foi mais lento nas amostras digeridas com NALC na proporção volume/volume, os demais agentes mucolíticos favoreceram uma rápida passagem do espécime através da membrana.

Após a fixação e coloração do esfregaço produzido com exceção do hipoclorito de sódio 10%, todos os agentes mucolíticos permitiram a visualização de BAAR com o auxílio de microscópio.

**TABELA 4 – ANÁLISE QUALITATIVA DO DESEMPENHO DAS SOLUÇÕES MUCOLÍTICAS UTILIZADAS NO SISTEMA BACFIL.**

Ajustes:	Digestão/ Filtração <sup>a</sup>	Tempo de Filtração <sup>b</sup>	Detecção de BAAR <sup>a</sup>
NALC:			
10 % volume da amostra	Sim	Rápido	Sim
volume/volume da amostra	Sim	Lento	Sim
Hipoclorito de Sódio:			
5%	Sim	Rápido	Sim
10%	Sim	Rápido	Não
Etanol-Triton 1%:			
Utilização	Sim	Rápido	Sim
Não utilização	Não	Não se aplica	Não se aplica

a – Sim ou Não

b – Rápido (< 20 minutos); Lento (> 20 minutos)

## 5.2 Acurácia do Sistema BacFil para o Diagnóstico da Tuberculose pulmonar.

Um total de 331 pacientes com suspeita clínica de TB foi selecionado para esse estudo. O perfil dos pacientes está descrito na **TABELA 5**.

**TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS DO TOTAL PACIENTES SELECIONADOS PARA O ESTUDO.**

Características:		
Média de idade (anos $\pm$ DP) <sup>a</sup>	36,7 $\pm$ 14,08 (18 – 82)	
Sexo	Masculino (%)	Feminino (%)
	255 (77,0%)	76 (23,0%)
Diagnóstico Prévio de TB	Não (%)	Sim (%)
	298 (90,0%)	33 (10,0%)
Radiografia do Tórax	Não – Cavitário (%)	Cavitário (%)
	255 (77,0%)	76 (23,0%)
Reação de Anticorpos Anti – HIV 1/2	Negativo (%)	Positivo (%)
	323 (97,6%)	08 (2,4%)

<sup>a</sup> – Dados apresentados por média e desvio padrão.

A idade dos pacientes do estudo variou de 18 a 82 anos, com média de 36,7 anos. Em relação ao sexo, 255 (77%) pacientes foram do sexo masculino enquanto 76 (23%) do sexo feminino. Ao analisar o diagnóstico prévio de TB, verificou-se que 90,0% dos pacientes não tinham diagnóstico prévio de TB, os 10,0% restantes tiveram TB diagnosticada previamente com o mínimo de um ano. Quanto à radiografia do tórax, 77,0% dos pacientes não apresentaram cavidades no perfil radiográfico, os demais 23% dos pacientes apresentaram cavidades.

Um total de 14 pacientes, dentre os 331 arrolados, foram excluídos por terem resultados de cultura contaminados, impossibilitando a análise da sensibilidade e especificidade dos métodos de baciloscopia utilizados no estudo. Amostras dos 317 pacientes que permaneceram no estudo foram submetidas aos métodos de centrifugação e filtração. Contudo, dentre estes, um total de 193 pacientes tiveram suas amostras submetidas também ao exame direto de baciloscopia. Embora não previsto inicialmente, tal exame foi adicionado ao estudo após ser considerado de suma importância para os sistemas de saúde, se tratando do exame mais realizado mundialmente, apesar de sua baixa sensibilidade.

Os resultados obtidos das análises microscópicas a partir de esfregaços diretos, após centrifugação e filtração, estão descritos na **TABELA 6**. As taxas de positividade dos métodos de baciloscopia foram de 12,9%, 17,7% e 24,9%, respectivamente, para esfregaço direto, esfregaço após centrifugação e esfregaço após filtração pelo Sistema BacFil.

**TABELA 6 – COMPARAÇÃO DE TRÊS DIFERENTES MÉTODOS DE BACILOSCOPIA COM O EXAME DE CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS**

Esfregaço		Cultura	
		+	-
Direto*	+	25	0
	-	17	151
Centrifugado	+	56	0
	-	31	230
BacFil	+	79	0
	-	8	230

\* Dos 317 pacientes analisados, 193 possuíam exame microscópico direto

A cultura utilizada neste estudo, como padrão ouro, possibilitou a detecção de 87 (27,4%) casos com crescimento de micobactérias. Do total de micobactérias

isoladas dos pacientes analisados no estudo, todas foram identificadas como *M. tuberculosis*.

A análise dos resultados das baciloscopias diretas, após centrifugação e após filtração, comparadas com os resultados de cultura, está descrita na **TABELA 7**. O método de filtração foi 31,28% mais sensível do que o método de esfregaço direto e 26,43% mais sensível que o método de esfregaço após centrifugação. Todos os métodos avaliados foram 100% específicos em relação à cultura, gerando assim, um resultado de valor preditivo positivo de 100%. Já os valores preditivos negativos foram de 96,63%, 88,12% e 89,88%, respectivamente para os métodos de filtração, centrifugação e direto.

As colorações de Kinyoun e Auramina O, respectivamente utilizadas para as membranas brancas e pretas, ofereceram a mesma acurácia ao método de filtração pelo Sistema BacFil, e seus resultados semiquantitativos concordaram em 95,40% dos pacientes (Índice Kappa 0,96).

**TABELA 7 – ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS BACILOSCOPIAS DIRETAS, APÓS CENTRIFUGAÇÃO E APÓS FILTRAÇÃO PELO SISTEMA BACFIL, EM RELAÇÃO AOS RESULTADOS DE CULTURA.**

Esfregaço	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	RVN <sup>a</sup>	Índice Kappa
Direto <sup>b*</sup>	59,52% (43,3 – 74,4)	100,0% (97,6 – 100,0)	0,40	0,69
Centrifugado*	64,37% (53,4 – 74,3)	100,0% (98,4 – 100,0)	0,36	0,72
BacFil**	90,80% (82,7 – 95,9)	100,0% (98,4 – 100,0)	0,09	0,93

<sup>a</sup> Razão de verossimilhança negativa

<sup>b</sup> Dos 317 pacientes analisados, 193 possuíam exame microscópico direto

\* corados pelo método de Auramina O

\*\* corados pelos métodos de Kinyoun e Auramina O

Limitando-se a análise para os pacientes que apresentaram resultados de baciloscopia negativa ao exame concentrado por centrifugação e cultura positiva, o método de esfregaço após filtração detectou 7 (63,6%) de 11 pacientes com essa



característica (**TABELA 8**). Ainda em relação a esta tabela, pode-se verificar que o método de esfregaço após filtração detectou 15 (78,9%) de 19 pacientes com cultura positiva e imagem radiográfica sem cavidades, enquanto que o método de esfregaço após centrifugação detectou 8 (42,1%) dos mesmos 19 pacientes.

**TABELA 8 – ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DA BACIOSCOPIA PELO SISTEMA BACFIL E APÓS CENTRIFUGAÇÃO EM PACIENTES PAUCIBACILARES.**

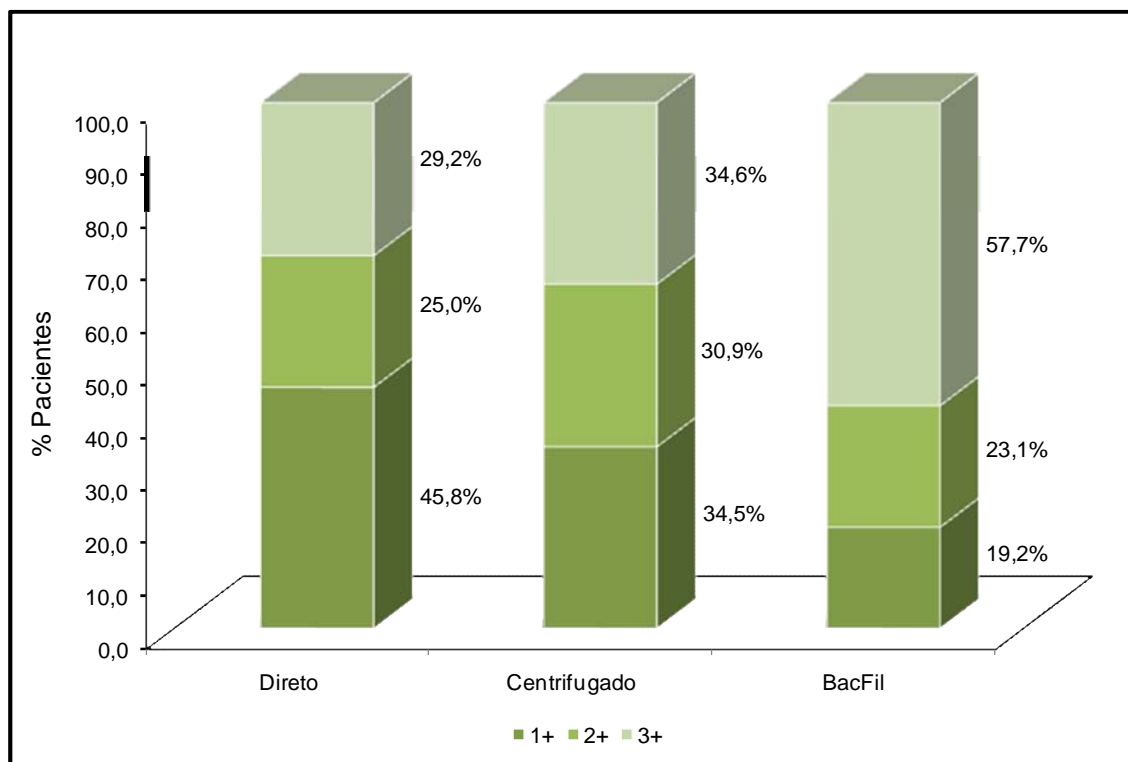
Pacientes:	Filtração	Centrifugação
	Sensibilidade	Sensibilidade
Baciloscopia negativa <sup>a</sup>	63,6%	0,00%
Rx não cavitário <sup>b</sup>	78,9%	42,1%

<sup>a</sup> Pacientes que apresentaram resultados de baciloscopia negativa ao exame concentrado por centrifugação e cultura positiva

<sup>b</sup> Pacientes que não apresentaram através da radiografia de tórax lesões cavitárias superiores a 1 cm de diâmetro

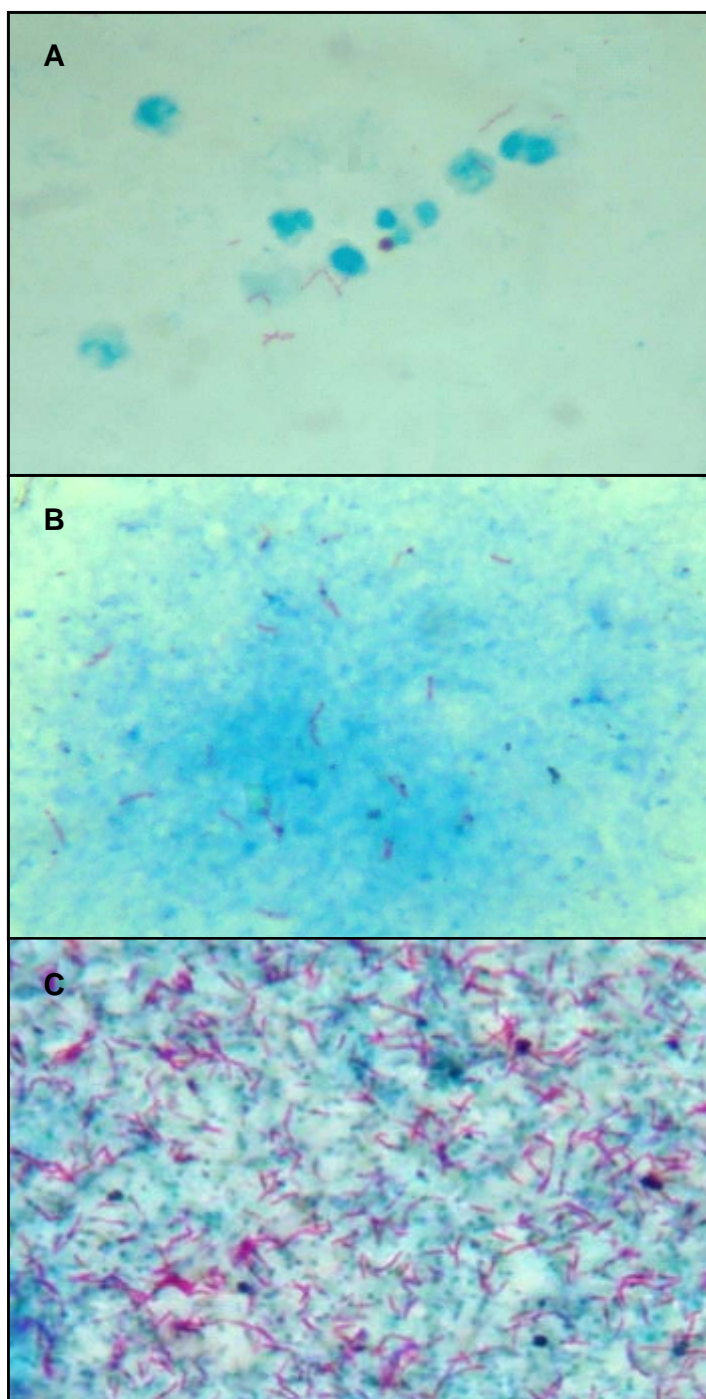
A análise semiquantitativa dos resultados de baciloscopias positivas para os métodos avaliados está representada no **GRÁFICO 1**. Como o Sistema BacFil propiciou um aumento da concentração de bacilos na superfície da membrana, o número de BAAR/campo microscópico foi proporcionalmente maior do que o constado nos dois outros métodos.

**GRÁFICO 1 – RESULTADO DA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DA BACILOSCOPIA DOS ESFREGAÇOS DIRETOS, CENTRIFUGADOS E FILTRADOS PELO SISTEMA BACFIL**



\* Dos 317 pacientes analisados, 193 possuíam exame microscópico direto

O aumento na concentração de BAAR nos esfregaços pelo método de concentração após filtração foi observado, de acordo com a **FIGURA 5**, em relação aos esfregaços diretos e após centrifugação.



A – Esfregaço direto da amostra de escarro.

B – Esfregaço preparado após centrifugação da amostra de escarro.

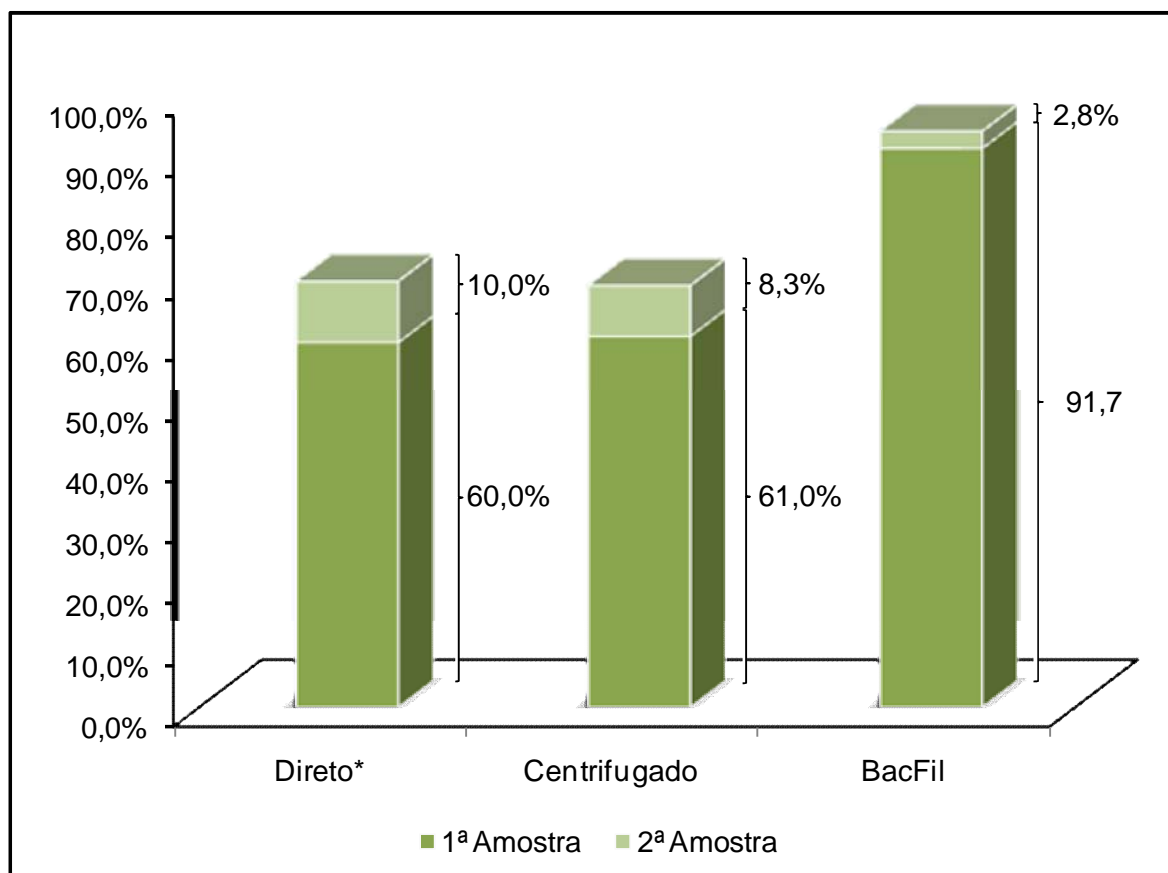
C – Esfregaço preparado após filtração pelo sistema BacFil da amostra de escarro.

**FIGURA 5** – Concentração de BAAR por campo microscópico de cada um dos métodos de baciloscopia testados. Fotografias obtidas com uma amplificação de 1000X. Todos os esfregaços foram preparados a partir da mesma amostra

Dos 317 pacientes iniciais, com amostras processadas pelos métodos de centrifugação e filtração, 114 coletaram a segunda amostra. Desses, 3 (8,3%) baciloscopias após centrifugação foram positivas apenas na segunda amostra e 1 (2,77%) baciloscopia após filtração foi positiva apenas na segunda amostra. Já dos 193 pacientes com resultados microscópicos de esfregaços diretos, 65 coletaram a segunda amostra, e em apenas 1 paciente o resultado foi positivo apenas na segunda amostra. O método de filtração obteve o menor incremento oferecido pela segunda amostra em relação aos métodos de esfregaço direto e após centrifugação.

O incremento na sensibilidade pela segunda amostra nos métodos de esfregaço direto, após centrifugação e após filtração, está apresentado no **GRÁFICO 2**.

**GRÁFICO 2 – INCREMENTO DA SENSIBILIDADE PELA SEGUNDA AMOSTRA NOS DIFERENTES MÉTODOS DE ESFREGAÇO UTILIZADOS**



\* Dos 114 pacientes analisados, 65 possuíam exame microscópico direto

### 5.3 Avaliação dos Padrões de Concordância Intra – Leitores

Com objetivo de avaliar a proficiência dos leitores A e B no exame microscópico e interpretação dos resultados da baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen, foram realizados 45 esfregaços diretos de amostras de escarro e as lâminas foram analisadas por dois leitores separadamente. Os resultados dos leitores A e B foram comparados à leitura padrão do laboratório de micobacteriologia. Todos os esfregaços com resultado negativo para a análise dos leitores A e B concordaram com a análise padrão. Para os esfregaços com resultado positivo, 12 (26,67%) dos 45 esfregaços preparados, os resultados das análises microscópicas dos leitores A e B concordaram em 100% dos esfregaços positivo (+), positivo (++) e positivo (+++). Os dados de concordância e índices Kappa dos leitores A e B em relação à leitura padrão estão apresentados na **TABELA 9**.

**TABELA 9 – VALORES DE CONCORDÂNCIA DAS LEITURAS BACILOSCÓPICAS INTRA E ENTRE - LEITORES E DA LEITURA PADRÃO**

Leitores	Valores de Concordância Intra e Entre-Leitores					
	Leitor A		Leitor B		Leitor C <sup>a</sup>	
	Co <sup>b</sup>	K <sup>c</sup>	Co <sup>b</sup>	K <sup>c</sup>	Co <sup>b</sup>	K <sup>c</sup>
A	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
B	-	-	1,0	1,0	1,0	1,0

<sup>a</sup> Técnico responsável pela análise dos esfregaços do Laboratório de Micobacteriologia

<sup>b</sup> Concordância Observada

<sup>c</sup> Índice Kappa

Além da avaliação de proficiência, adotou-se como procedimento de controle de qualidade interno dos exames microscópicos, a re-leitura de todas as lâminas com resultados positivos e 10% das lâminas com resultados negativos, realizada por um segundo leitor. Após a análise dos resultados microscópicos, observou-se uma concordância de 100% entre os leitores (Índice Kappa 1,00).

*Discussão*

---

## **6 Discussão**

O diagnóstico laboratorial precoce é de suma importância para o controle da TB, uma vez que possibilita a implantação de medidas profiláticas e instituição de terapia adequada, reduzindo assim, a capacidade do paciente transmitir a doença (TENOVER et al., 1993; DROBNIEWSKI et al., 2003; PASCOPELLA et al., 2004; WHO, 2006).

Mais de 90% dos pacientes com tuberculose vivem em países em desenvolvimento, onde o diagnóstico da TB é realizado principalmente pela identificação de BAAR em esfregaços preparados diretamente dos espécimes clínicos corados pela técnica de Ziehl Neelsen e visualizados em microscópios convencionais (DYE et al., 2005). Além da simplicidade e do baixo custo financeiro, a baciloscopia é facilmente aplicada em países com alta prevalência de TB (WHO, 1998; BRASIL, 2001).

No entanto, a baciloscopia apresenta limitações, pois a positividade do exame só é alcançada em amostras com uma grande concentração de BAAR (5.000 bacilos/ml) (DAVID, 1976). Este fato reduz assim, a sensibilidade da baciloscopia no diagnóstico da doença em seu estágio inicial em pacientes com ausência de lesões cavitárias e com incapacidade de produção de escarro. (FERREIRA et al., 2005; PALACI et al., 2007).

Diante destas limitações, nos propusemos neste estudo, otimizar e avaliar o desempenho do método de baciloscopia após concentração por filtração através de membranas de policarbonato desenvolvido por Smithwick & Stratigos (1981), aprimorado por Birnbaum & Fennelly (2003) e denominado por nosso grupo como Sistema BacFil.

Inicialmente avaliamos os componentes que fazem parte do protótipo, para que o mesmo obtivesse o melhor desempenho no processo de filtração de espécimes.

Nesta fase inicial do estudo, submetemos o Sistema BacFil à força de diferentes pressões, uma vez que Smithwick & Stratigos (1981) não relataram a pressão a que o sistema foi submetido em seus ensaios. As pressões de 10 e 20 mmHg foram suficientes para forçar a passagem do espécime através da membrana, entretanto

optamos por utilizar a pressão de 20 mmHg por considerarmos que a mesma realizasse o processo em um período menor de tempo.

Definimos também, pela utilização de membranas de policarbonato com poros de 0,8 µm, diferentemente de Smithwick & Stratigos (1981) que utilizaram membranas de policarbonato com poros de 1,0 µm, porque constatamos que as membranas com poros menores aumentaram a concentração do espécime sobre a superfície da mesma.

Em relação aos anéis de teflon, descrita por Birnbaum & Fennelly (2003), para limitar a área de filtração sobre as membranas, optamos por não adotá-los, porque os resultados dos nossos experimentos demonstraram que a utilização dos mesmos limitava a área de filtração para 0,5 cm de diâmetro, fato este que favorece a saturação e rompimento das membranas uma vez que os espécimes clínicos possuem muita matéria orgânica.

Outras considerações importantes realizadas na fase de padronização do Sistema BacFil, foram a utilização de suportes com o diâmetro menor do que o utilizado por Smithwick & Stratigos (1981), possibilitando uma maior concentração do espécime sobre a membrana e a substituição do suporte de vidro, utilizado por Smithwick & Stratigos (1981), por um suporte de aço inox, o qual é mais resistente ao calor e a substâncias químicas, reduzindo assim o custo do sistema.

O NALC, agente mucolítico destinado a digerir os espécimes, foi utilizado em nossos experimentos a uma concentração final de acordo com o recomendado por Kent & Kubica (1985), para que a amostra de escarro fosse dividida em duas alíquotas. Entretanto, utilizamos um volume menor para reduzir o gasto de insumos e o tempo de filtração dos espécimes; além disso, verificamos também, que o volume da solução de NALC utilizado não interferiu na liquefação dos espécimes além de permitir a divisão das amostras em alíquotas com o mesmo volume e com uma carga bacilar equitativa (dados ainda não publicados).

Além do NALC, o hipoclorito de sódio tem sido descrito por vários autores como um eficiente agente mucolítico, que também auxilia no aumento da acurácia da baciloscopia (GEBRE et al., 1995; PALHARES et al., 1996; ÄNGEBY et al., 2000;



VAN DEUN et al., 2000; GITHUI et al., 2007; MATU et al., 2007; EYANGO et al., 2008).

Com base nos resultados do estudo de Oliver & Reusser (1942), Smithwick & Stratigos (1981) utilizaram hipoclorito de sódio e etanol para o processamento e filtração de escarros através de membranas de policarbonato e verificaram uma maior liquefação dos espécimes e sedimentação dos bacilos. Em nosso estudo, com a finalidade de otimizar ainda mais a passagem dos espécimes através das membranas no Sistema BacFil, acrescentamos também às soluções descritas por Smithwick & Stratigos (1981), uma solução de Triton X-100. Por ser um potente detergente, a utilização do Triton X-100 resultou em um melhor fluxo da amostra através da membrana, reduzindo assim o tempo de realização do procedimento.

A utilização do NaOCL no sistema BacFil teria ainda, supostamente, um elevado poder desinfetante, diminuindo assim, o risco de infecção durante os procedimentos laboratoriais. Ängeby e colaboradores (2000) afirmaram que a utilização do hipoclorito de sódio nos procedimentos para realização de esfregaços reduz o risco de infecção ocupacional, pois mata as micobactérias. Entretanto, Githui e colaboradores (2007b) afirmaram que a solução de hipoclorito de sódio 5% somente tem a ação desinfetante quando é exposta ao espécime por um tempo superior a 15 horas, ao contrário da exposição por 15 minutos descrita por Yassin e colaboradores (2003b).

Após a fase de aperfeiçoamento, avaliamos o Sistema BacFil para o exame baciloscópico de escarro em uma população de 331 pacientes com suspeita clínica de tuberculose.

Nesta população de pacientes, foi constatada uma média de idade de 36,7 anos, o que está de acordo com o observado por outros autores em estudos realizados no Brasil e na Espanha (Castilla et al., 1997; GARCIA et al., 2000; PALACI et al., 2007; WHO, 2008). A relação homem/mulher mostrou um predomínio de homens, o que está de acordo com estudos realizados em outra região do Brasil e em outros países. (HOLMES et al., 1998; BOFFO et al., 2004). Talvez, uma combinação de fatores biológicos e sociais seja responsável por esta relação, os quais determinam

distinções fisiológicas, diversidade de comportamentos, expectativas que coexistem em um contexto social, econômico e cultural (BOFFO et al., 2004).

Na presente população encontramos ainda cavidades pulmonares em 87,4% dos pacientes com resultado de cultura positiva. No restante, houve envolvimento do tórax sem evidência de comprometimento dos pulmões. A taxa de aparecimento de lesões cavitárias é muito variável na literatura, com relatos de 40 a 87% dos pacientes adultos em algum ponto durante o curso da doença (McADAMS et al., 1995; AKTOGU et al., 1996; WILCKE et al., 1998)

Em relação à infecção pelo HIV, observamos uma taxa de 2,4% de soropositividade, entretanto, em nenhum destes pacientes obteve-se exames de baciloscopia e/ou cultura de micobactérias positivos. O estado do Espírito Santo, de acordo com as notificações junto ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação, no período de 2000 a junho de 2006, possuía uma incidência de 17 casos de AIDS para cada 100.000 habitantes. Quando restringimos a análise somente para as cidades que compõem a região Metropolitana da Grande Vitória, essa incidência aumenta para aproximadamente 27 casos de AIDS para cada 100.000 habitantes no período de 2000 a 2005, um número bem superior a média nacional que foi de aproximadamente 17 casos de AIDS para cada 100.000 habitantes no mesmo período (BRASIL, 2007). Por outro lado, a taxa de co-infecção TB/HIV no estado é baixa, ainda por motivos desconhecidos.

Ao analisarmos os resultados comparativos entre os métodos de baciloscopia na população estudada, verificamos um aumento significativo de sensibilidade pelo sistema de concentração de amostra de escarro por filtração (Sistema BacFil). Este método proporcionou uma sensibilidade de 90,8% quando comparado ao exame de cultura. Muito superior a 64,4% e 59,5% encontrados, respectivamente, pelos métodos de concentração de amostras por centrifugação e esfregaço direto. As sensibilidades dos métodos de baciloscopias direta e após centrifugação obtidas em nosso estudo foram semelhantes ao observado por Smithwick & Stratigos (1981), 55,8% para o esfregaço direto e 62,2% para o esfregaço após centrifugação, entretanto, a sensibilidade de 80,2% por estes autores para os esfregaços preparados após filtração foi inferior à encontrada no presente estudo. A diferença de aproximadamente 10,0% na sensibilidade das baciloscopias após filtração entre o

estudo realizado por Smithwick & Stratigos (1981) e o nosso pode ser explicado pela redução do tamanho das membranas utilizadas no Sistema BacFil, possibilitando assim, uma maior concentração do espécime sobre a área de filtração.

Todos os pacientes com resultados positivos nas baciloscopias realizadas após a filtração pelo Sistema BacFil foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), tão logo os dados microbiológicos foram comparados aos clínicos. Isso ratifica a boa eficiência do método no diagnóstico da TB, como descrito anteriormente por Smithwick & Stratigos (1981).

As sensibilidades das baciloscopias direta e após centrifugação obtidas em nosso estudo foram semelhantes também ao observado por Allwood e colaboradores (1997) na Malásia, Ängeby e colaboradores (2000) em Honduras, Farnia e colaboradores (2002) no Irã, para os esfregaços preparados diretamente da amostra de escarro, e por Gebre e colaboradores (1995) na Etiópia, Peterson e colaboradores (1999) na Bacia do Pacífico e Merid e colaboradores (2009), para os esfregaços preparados após centrifugação dos espécimes.

As técnicas de coloração de esfregaços utilizados no diagnóstico de TB, coloração de Ziehl – Neelsen, Kinyoun ou fluorescência, são muito específicas para detecção de micobactérias, principalmente em regiões de alta prevalência da doença. A especificidade dos métodos de baciloscopia utilizados em nosso estudo foi de 100%. Esse valor é sustentado por diversos autores que observaram valores de especificidade superiores a 90% (SMITHWICK & STRATIGOS, 1981; GEBRE et al., 1995; ALLWOOD et al., 1997; WILKINSON & STURM, 1997; BRUCHFELD et al., 2000; FARNIA et al., 2002; APERS et al., 2003).

A sensibilidade da baciloscopia, seja ela realizada diretamente da amostra ou após concentração por centrifugação, tende a diminuir drasticamente nos pacientes que eliminam poucos bacilos, principalmente aqueles no estágio inicial da doença ou co-infectados com TB/HIV (COLEBUNDERS et al., 1989; KLEIN et al., 1989; KRAMER et al., 1990; LONG et al., 1991; ELLIOTT et al., 1993; ALPERT et al., 1997). Apesar dessa tendência, o Sistema BacFil foi capaz de detectar aproximadamente 63,0% dos casos de TB com resultados negativos de baciloscopia após centrifugação e confirmados em cultura. Contudo, essa observação deve ser comprovada através de

um estudo com um maior número de amostras paucibacilares, uma vez que este foi considerado reduzido em neste estudo.

A formação de cavidade é o resultado final da formação do granuloma local e necrose com subsequente liquefação e drenagem do material caseoso para a árvore brônquica, liberando assim os bacilos para o meio externo (JOHNSON et al., 1997). Segundo, Palaci e colaboradores (2007), que realizaram um estudo onde observaram que pacientes com TB pulmonar cavitária possuíam uma carga bacilar significativamente maior do que os pacientes que não apresentavam lesões cavitárias, ou seja, esses últimos eliminam uma quantidade menor de bacilos, portanto são mais difíceis de serem detectados através dos métodos de baciloscopia convencionais. Entretanto, o método de baciloscopia após filtração pelo Sistema BacFil detectou mais de 75,0% dos casos confirmados de TB em pacientes que não apresentavam perfis radiográficos com cavidades.

Outro fato relevante observado em nosso estudo, como consequência da concentração da amostra no sistema BacFil, foi o aumento proporcional de BAAR por campo microscópico pela análise semiquantitativa, o que tornou a leitura do esfregaço mais fácil e rápida. Estes resultados reforçam mais uma vez a eficiência deste sistema e corroboram os resultados obtidos por Smithwick & Stratigos (1981), que, ao comparar o sistema de filtração e de centrifugação de amostras para análise baciloscópica, constataram uma concentração de BAAR aproximadamente 20 vezes maior pelo primeiro método.

Em relação ao número de amostras ideal para o diagnóstico da TB, Enarson e colaboradores (1994) observaram que seria necessária a coleta de três amostras por paciente, para se aumentar a sensibilidade da baciloscopia. Por outro lado, Yassin & Cuevas (2003), afirmaram que a coleta de dois espécimes por paciente seria suficiente para detectar 99% dos casos de TB na Etiópia, reduzindo assim, a carga de trabalho dos técnicos microscopistas. O Ministério da Saúde (2008) também recomenda que cada paciente colete duas amostras, visando o aumento da sensibilidade da baciloscopia. De acordo com Yassin & Cuevas (2003) a coleta da segunda amostra aumentou aproximadamente em 7,0% a sensibilidade da baciloscopia diretamente da amostra, valor esse, compatível ao observado no presente estudo, embora o número de pacientes com TB confirmada que coletaram

a segunda amostra foi extremamente restrito. Entretanto, a baciloscopia após filtração pelo Sistema BacFil obteve o menor incremento na sensibilidade, em relação aos esfregaços direto e após concentração por centrifugação nos pacientes com TB confirmada em cultura que coletaram a segunda amostra, porém, esse menor incremento é justificado pela alta sensibilidade do método de filtração utilizado no estudo, que apenas com a coleta de uma amostra superou a sensibilidade dos métodos direto e após centrifugação com a coleta de duas amostras.

A realização de um controle de qualidade em relação às baciloscopias está prevista na Série TELELAB, módulo Tuberculose: Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia (BRASIL, 2001). A garantia da qualidade em relação à bacteriologia da TB é um sistema delineado para melhorar continuamente a confiabilidade, eficiência e uso dos serviços laboratoriais de TB. (BRASIL, 2001).

Segundo o Consenso Global (APHL/CDC, 2002), é de se esperar que a concordância em análises baciloscópicas duplo-cegas seja próxima de 95% para esfregaços altamente positivos (2+ e 3+) e de 30% a 50% para os esfregaços inconclusivos (1-9 BAAR/100 campos). Entretanto, em nosso estudo, tanto para a re-análise quanto para o estudo paralelo de proficiência, a concordância observada e o índice de concordância Kappa entre os técnicos participantes foram 100% e 1,00, respectivamente. De acordo com a escala de concordância Kappa proposto por Pereira (2002), esse índice é perfeito. Nossos dados estão próximos ao observado por Hugo David (apud TOMAN, 2004) que sob ótimas condições de leitura e essas realizadas por leitores experientes, as reprodutibilidades das leituras baciloscópicas tiveram concordância de 96 e 93%.

Uma possível limitação do método de baciloscopia após filtração pelo Sistema BacFil é a necessidade de análise do esfregaço o mais rápido possível, uma vez que a coloração se perde em no máximo uma semana. Esse fato dificulta a realização de controle de qualidade externo.

O custo para a montagem do Sistema BacFil, material permanente, é relativamente alto, pois é de aproximadamente R\$7.000,00, considerando a cotação do dólar (R\$2,37) de vinte de janeiro de dois mil e nove, para a montagem do protótipo

composto por um suporte de PVC, uma bomba de vácuo Mityvac<sup>®</sup>, dez suportes de filtro em aço inox de 13 mm de diâmetro Millipore<sup>™</sup>, um conjunto composto por doze suportes de filtro de polipropileno de 25 mm de diâmetro Millipore<sup>™</sup>, um erlenmeyer de polipropileno e mangueira. Por outro lado, cada teste realizado pelo Sistema BacFil tem o custo de aproximadamente R\$11,00, desconsiderando o valor aplicado na montagem do protótipo e custo referente a pagamento de pessoal, valor esse, muito superior ao de uma baciloscopia convencional, porém, inferior a um teste utilizando o meio de cultura MGIT 960 (Becton Dickinson<sup>™</sup>, NJ, EUA).

Apesar de reunir estas características que o credencie como um método promissor para o diagnóstico rápido da tuberculose, estamos cientes que este protótipo de sistema de filtração ainda necessita ser aperfeiçoado no aspecto operacional, através do desenvolvimento de: (i) painel de suporte para as seringas em aço inoxidável; (ii) maior número de pontos de seringas para filtração; (iii) reservatório de descarte mais funcional; (iv) sistema de pressão a vácuo através de uma bomba de pulso constante (para substituir o processo manual).

Em face as estas melhorias consideramos também que o sistema de concentração de amostras por filtração deva ser submetido a um estudo multicêntrico (Fase III), para validar a sua performance no diagnóstico da tuberculose pulmonar e ,assim, ser utilizado amplamente em nosso país.

*Conclusões*

---

## 7 Conclusões

1. A filtração de amostras de escarro pelo Sistema BacFil apresentou-se como uma alternativa para o exame baciloscópico, pois possibilitou uma ótima acurácia no diagnóstico da TB;
2. O método de baciloscopia realizada pelo Sistema BacFil mostrou-se mais sensível do que as baciloscopias realizadas diretamente da amostra e após concentração por centrifugação;
3. A análise semiquantitativa dos esfregaços preparados pelo Sistema BacFil, corados pelas técnicas de Kinyoun e Auramina O, não apresentaram diferenças quanto a sensibilidade no diagnóstico da TB pulmonar;
4. O método de baciloscopia após filtração pelo Sistema BacFil apresentou uma alta sensibilidade para o diagnóstico de TB em pacientes paucibacilares.
5. O Sistema BacFil, em razão de sua elevada acurácia demonstrou não haver necessidade da coleta da segunda amostra de escarro para realização de baciloscopia. Se validado, isto poderia contribuir para a diminuição dos custos, carga e tempo de trabalho;
6. Pode ocorrer perda de coloração dos BAAR nos esfregaços corados pela técnica de Kinyoun após um curto período de tempo, o que dificultaria a realização de controle de qualidade externo;
7. O protótipo do Sistema BacFil necessita ser aperfeiçoado no aspecto operacional, pois após os resultados obtidos, o método está credenciado como uma promissora ferramenta para o diagnóstico rápido da TB;
8. O Sistema BacFil mostrou-se um procedimento com custo relativamente baixo, operacionalmente simples e rápido para o diagnóstico da TB.



## *Referências Bibliográficas*

---

## 8 Referências Bibliográficas

ABER V. R.; ALLEN B. W.; MITCHISON D. A.; AYUMA P.; EDWARDS E. A.; KEYES A. B. Quality control in tuberculosis bacteriology. 1. Laboratory studies on isolated positive cultures and the efficiency of direct smear examination. **Tubercle**; v. 61, p. 123 – 133, 1980.

AKTOGU S.; YORGANCIOGLU A.; ÇIRAK K.; KOSE T.; DERELI S. M. Clinical spectrum of pulmonary and pleural tuberculosis: a report of 5480 cases. **Europ resp J**, v. 9, p. 2031 – 2035, 1996.

ALLWOOD M.; LEE Y.; SALANIPONI F.; NYANGULU D.; KUPPUSAMY I.; SQUIRE S. Case-finding with a single sputum sample and household bleach. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 1, supl. 1, S144, 1997.

ALPERT P. L.; MUNSIF S. S.; GOUREVITCH M. N.; GREENBERG B.; KLEIN R. S. A prospective study of tuberculosis and human immunodeficiency virus infection: clinical manifestations and factors associated with survival. **Clin Infect Dis**, v. 24, n. 4, p. 661 – 668, 1997.

AMERICAN THORACIC SOCIETY: diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, n. 4, p. 1376 – 1395, 2000.

ANDERSEN D. Microbiological diagnostic procedures in respiratory infections: mycobacterial infections. **Pediatric Respiratory Reviews**, v. 8, p. 221 – 230, 2007.

ÄNGEBY K. A.; ALVARADO-GALVEZ C.; PINEDA-GARCIA L.; HOFFNER S. E. Improved sputum microscopy for a more sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 4, p. 684 – 687, 2000.

APERS L.; MUTSVANGWA J.; MAGWENZI J.; CHIGARA N.; BUTTERWORTH A.; MASON P.; VAN DER STUYFT P. A comparison of direct microscopy, the concentration method and the Mycobacteria Growth Indicator Tube for the examination of sputum for acid-fast bacilli. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 7, n. 4, p. 376 – 381, 2003.

APHL/CDC - Association of Public Health Laboratories/Centers of Disease Control and Prevention. **External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy**. Washington, DC: APHL, 2002.

ARANAZ A.; LIÉBANA E.; GÓMEZ-MAMPASO E.; GALÁN J.C.; COUSINS D.; ORTEGA A.; BLÁZQUEZ J.; BAQUERO F.; MATEOS A.; SÚAREZ G.; DOMÍNGUEZ L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolated from goats in Spain. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 49, p. 1263 – 1273, 1999.

BA F.; RIEDER H. L. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 3, n. 12, p. 1101 – 1105, 1999.

BADAK F. Z.; GOKSEL S.; SERTOZ R.; NAFIL B.; ERMERTCAN S.; CAVUSOGLU C.; BILGIC A. Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. **J Clin Microbiol**, v. 37, p.1602 – 1605, 1999.

BIRNBAUM L.; FENNELLY K. P. Improving the sensitivity of microscopy to detect mycobacteria. **Am J Resp Crit Care Med**, v. 167: A710 (abstract), 2003.

BOFFO M. M. S.; MATTOS I. G.; RIBEIRO M. O.; OLIVEIRA NETO, I. C.. Tuberculose associada à AIDS: características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes atendidos em um serviço de referência do sul do Brasil. **J Bras Pneumol. [online]**, v. 30, n. 2, p. 140 – 146, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. **Manual TELELAB. 2001. Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia**. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. **II Consenso brasileiro de tuberculose – 2004**. J Bras Pneumol, v. 30, supl. 1, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle**

---

**da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço.** 5 ed., Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de atenção básica. **Manual Técnico de Controle da TB: Cadernos de atenção básica.** 6. Ed. Brasília, 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias.** Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Espírito Santo.** Brasília, 2007.

BRODIE D.; SCHLUGER N. W. The diagnosis of tuberculosis. **Clin Chest Med**, v. 26, n. 2, p. 247 – 271, 2005.

BRUCHFELD J.; ADERAYE G.; PALME I. B.; BJORVATN B.; KALLENIOUS G.; LINDQUIST L. Sputum concentration improves diagnosis of tuberculosis in a setting with a high prevalence of HIV. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 94, p. 677 – 680, 2000.

BUIJTELS P. C. A. M.; PETIT P. L. C. Comparison of NaOH-*N*-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **J Microbiol Methods**, v. 62, p. 83 – 88, 2005.

CASTILLA J.; GUTIÉRREZ A.; GUERRA L.; PÉREZ DE LA PAZ J.; NOGUER I.; RUIZ C.; BELZA M. J.; CAÑÓN J. Pulmonary and extrapulmonary tuberculosis at AIDS diagnosis in Spain: epidemiological differences and implications for control, **AIDS**, v. 11, n. 13, p. 1583 – 1588, 1997.

Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. **MMWR**, v. 54, p. 49 – 55, 2005.

CHAN E. D.; HEIFETS L.; ISEMAN M. D. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. **Tuber Lung Dis**, v. 80, n.3, p. 131 – 140, 2000.

COLEBUNDERS R. L.; RYDER R. W.; NZILAMBI N.; DIKILU K.; WILLAME J. C.; KABOTO M.; BAGALA N.; JEUGMANS J.; MUEPU K.; FRANCIS H. L.; et al. HIV infection in patients with tuberculosis in Kinshasa, Zaire. **Am Rev Respir Dis**, v. 139, n. 5, p. 1082 – 1085, 1989.

COLLINS C. H.; GRANGE J. M.; YATES M.D. Direct smears. In: Collins, C. H.; Grange, J. M.; Yates, M. D. (Ed). **Tuberculosis bacteriology: organization and practice**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997.

CONTIJO FILHO P. P.; FONSECA K. S. The flotation method for detection of tubercle bacilli in sputum smears. **Tubercle**, v. 60, n. 2, p. 105 – 107, 1979.

COUSINS D.V.; BASTIDA R.; CATALDI A.; QUSE V.; REDROBE S.; DOW S.; DUIGNAN P.; MURRAY A.; DUPONT C.; AHMED N.; COLLINS D.M.; BUTLER W.R.; DAWSON D.; RODRÍGUEZ D.; LOUREIRO J.; ROMANO M. I.; ALITO A.M.; ZUMARRAGA M.; BERNADELLI A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, p. 1305 – 1314, 2003.

DANIEL T. M. Captain of death: the story of tuberculosis. Rochester, New York, USA: **University of Rochester Press**, 1997.

DANNENBERG A.M. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Rev Infect Dis**, v. 11, p. 369 – 378, 1989.

DAVID H. L. *Bacteriology of mycobacterioses*. **Centre for Disease Control**, Atlanta & US Public Health Service, PHS, HEW, Superintendent of Documents, US Govt Printing Office, Washington DC, 1976.

DOWDY D. W.; MATERS A.; PARRISH N.; BEYRER C.; CORMAN S. E. Cost-effectiveness analysis of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct test as used routinely on smear-positive respiratory specimens. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 948 – 953, 2003.

DROBNIIEWSKI F. A.; CAWS M.; GIBSON A.; YOUNG D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. **Lancet**, v. 3, p. 141 – 147, 2003.

- DUNLAP N. E.; BASS J.; FUJIWARA P.; HOPEWELL P.; HORSBURGH C. R.; SALFANGI M. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, p. 1376 – 1395, 2000.
- DYE C.; WATT C. J.; BLEED D. M.; HOSSEINI S. M.; RAVIGLIONE M. C. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. **JAMA**, v. 293, p. 2767 – 2775, 2005.
- ELLIOTT A. M.; NAMAAMBO K. ALLEN B. W.; LUO N.; HAYES R. J.; POBEE J. O.; McADAM K. P. Negative sputum smear results in HIV-positive patients with pulmonary tuberculosis in Lusaka, Zambia. **Tuber Lung Dis**, v. 74, n. 3, p. 191 – 194, 1993.
- ENARSON D.; JENTGENS H.; OBERHOFFER M.; et al. Tuberculosis Guides for High Prevalence Countries, 2nd ed. **IUATLD**, Paris, 1994.
- EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**. Disponível em: (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>) Acesso em 29 out. 2008.
- EYANGO S. I.; TORREA G.; TEJIOKEM M. C.; KAMDEM Y. PIAM F. F.; NOESKE J.; VAN DEUN A. HIV-related incremental yield of bleach sputum concentration and fluorescence technique for the microscopic detection of tuberculosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 9, p. 849 – 855, 2008.
- FARNIA P.; MOHAMMADI F.; ZARIFI Z.; TABATABEE D. J.; GANAVI J.; GHAZISAEEDI K.; FARNIA P. K.; GHEYDI M.; BAHADORI M.; MASJEDI M. R.; VELAYATI A. A. Improving sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum: use of chitin in mucus digestion. **J Clin Microbiol**, v.40, p. 508 – 511, 2002.
- FERREIRA A. A. A.; Queiroz K. C. S.; TORRES K. P.; FERREIRA M. A. F; ACCIOLY H.; ALVES M. S. C. F. 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.
- FISHMAN A. **Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: McGraw – Hill, p. 2450 – 2461, 1998.

- FURIN J.J.; JOHNSON J.L. Recent advances in the diagnosis and management of tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**, v. 11, n. 3, p. 189 – 194, 2005.
- GARAY J. E. Analysis of a simplified concentration sputum smear technique for pulmonary tuberculosis diagnosis in rural hospitals. **Trop.Doct**, v. 30, p. 70 – 72, 2000.
- GARAY S.M. **Pulmonary tuberculosis**. In Rom, W.N.; Garay, S. (Ed). Tuberculosis. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 345 – 394.
- GARCIA G. F.; CORRÊA P. C. R. P.; MELO M. G. T.; SOUZA M. B. Prevalência da infecção pelo HIV em pacientes internados por tuberculose. **J Pneumol**, v. 26, p. 189 – 193, 2000.
- GEBRE N.; KARLSSON U.; JÖNSSON G.; MACADEN R.; WOLDE A.; ASSEFA A.; MIÖRNER H. Improved microscopical diagnosis of pulmonary tuberculosis in developing countries. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 89, n. 2, p. 191 – 193, 1995.
- GIAMPAGLIA C. M.; MARTINS M.; VIEIRA G. B.; VINHAS S. A.; TELLES M. A.; PALACI M.; MARSICO A. G.; HADAD D. J.; MELLO F. C.; FONSECA L. S.; KRITSKI A. Multicentre evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 11, n. 9, p. 986 – 991, 2007.
- GIAMPAGLIA C.M.S.; MARTINS M.C.; INUMARU V.T.G.; BUTUEM I.V.; TELLES M.A.S. Evaluation of a rapid differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with p-nitrobenzoic acid and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 9, p. 206 – 209, 2005.
- GIKOVATE F.; NOGUEIRA D.P. Abreugrafia sistemática em massa: Inviabilidade econômica e eventuais perigos da exposição a radiações. **Rev Saúde Públ**, v. 10, p. 103 – 110, 1976.
- GITHUI W. A.; MATU S. W.; MUTHAMI L. N.; JUMA E. Improved diagnosis of Ziehl-Neelsen smear negative tuberculosis using sodium hypochlorite sedimentation method. **East Afr Med J**. v. 84, n. 10, p. 455 – 459, 2007.

GITHUI W. A.; MATU S. W.; TUNGE N.; JUMA E. Biocidal effect of bleach on *Mycobacterium tuberculosis*: a safety measure. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 11, n. 7, p. 798 – 802, 2007b.

GITHUI W.; KITUI F.; JUMA E. S.; OBWANA D. O.; MWAI J.; KWAMANGA D. A comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **East Afr Med J**, v. 70, n. 5, p. 263 – 266, 1993.

GRANGE J.M. **Mycobacteria and human disease**. 2 Ed. London: University Press, 1996.

HAAS F.; HAAS S. S. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness, in: ROM WN e GARAY SM, **Tuberculosis**, USA, Little, Brown and Company, 1996.

HABEENZU C.; LUBASI D.; FLEMING A. F. Improved sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum in developing countries. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92 p. 415 – 416, 1998.

HALE Y. M.; PFYFFER G. E.; SALFINGER M. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. **Clin Infect Dis**, v. 33, p. 834 -846, 2001.

HANNA, B.A. **Laboratory diagnosis**. In Rom, W.N.; Garay, S.M. (Ed). Tuberculosis. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 163 – 181, 2004.

HAVLIR D. V.; BARNES P. F. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med**, v. 340, n. 5, p. 367 – 373, 1999.

HERSHKOVITZ I.; DONOGHUE H. D.; MINNIKIN D. E.; BESRA G. S; LEE O. Y.; GERNAEY A. M.; GALILI E.; ESHED V.; GREENBLATT C. L.; LEMMA E.; BAR-GAL G. K.; SPIGELMAN M. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. **PLoS ONE**, vol. 3, n. 10, p. e3426, 2008.

HOLMBERG S.D. The rise of tuberculosis in America before 1820. **Am Rev Respir Dis**, v. 142, n. 5, p. 1228 – 1232, 1990.



HOLMES C. B.; HAUSLER H.; NUNN P. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 2, n.2, p. 96 – 104, 1998.

JOHNSON J. L.; VJECHA M. J.; OKWERA A.; HATANGA E.; BYEKWASO F.; WOLSKI K.; AISU T.; WHALEN C. C.; HUEBNER R.; MUGERWA R. D.; ELLNER J. J.; Impact of human immunodeficiency virus type-1 infection on the initial bacteriologic and radiographic manifestations of pulmonary tuberculosis in Uganda. Makerere University-Case Western Reserve University Research Collaboration. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 2, n. 5, p.397 – 404, 1997.

KAUFMANN S.H.E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Rev**, v. 1, p. 20 – 30, 2001.

KENT P. T.; KUBICA G. P. **Public health mycobacteriology – a guide for level III laboratory**. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985. (publication nº PB 86-216546)

KLEIN N. C.; DUNCANSON F. P.; LENOX T. H.; PITTA A.; COHEN S. C.; WORMSER G. P. Use of mycobacterial smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in AIDS/ARC patients. **Chest**, v. 95, n. 6, p. 1190 – 1192, 1989.

KRAMER F.; MODILEVSKY T.; WALIANY A. R.; LEEDOM J. M.; BARNES P. F. Delayed diagnosis of tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. **Am J Med**, v. 89, n. 4, p. 451 – 456, 1990.

KUBICA G. P. Correlation of acid-fast staining methods with culture results for mycobacteria. **Bull. Int. Union. Tuberc**, v. 55, p. 117 – 124, 1980.

LASERSON K. F.; YEN N. T. N.; THORNTON C. G.; MAI V. T. C.; JONES W.; AN D. Q.; PHUOC N. H.; TRINH N. A.; NHUNG D. T. C.; LIEN T. X.; LAN N. T. N.; WELLS C.; BINKIN N.; CETRON M.; MALONEY S. A. Improved sensitivity of sputum smear microscopy after processing with C18-carboxypropylbetaine: a study of United States-bound immigrants from Viet Nam. **J. Clin. Microbiol**, v. 43, p. 3460 – 3462, 2004.

LIBERATO I.R.; DE ALBUQUERQUE M.F.; CAMPELO A.R.; DE MELO H.R. Characteristics of pulmonary tuberculosis in HIV seropositive and seronegative



MIÖRNER H.; GANLÖV G.; YOHANNES Z.; ADANE Y. Improved sensitivity of direct microscopy for acid-fast bacilli: sedimentation as an alternative to centrifugation for concentration of tubercle bacilli. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 12, p. 3206 – 3207, 1996.

MORGAN M. A.; HORSTMEIER C. D.; DeYOUNG D. R.; ROBERTS G. D. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. **J Clin Microbiol**, v.18, p. 384 – 388, 1983.

MURRAY J. F. *Mycobacterium tuberculosis* and the cause of consumption, from discovery to fact. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, p. 1086 – 1088, 2004.

MUSHER D.M. How contagious are common respiratory tract infection? **N Engl J Med**, v. 348, p. 1256 – 1266, 2003

NAGANATHAN N.; GANAPATHY K. T.; RAJALAKSHMI R. Evaluation of sputum smears prepared by different methods. **Indian J Med Res**, n. 69, p. 893–900, 1979.

NARAIN J.P.; LO Y.R. Epidemiology of HIV-TB in Asia. **Indian J Med Res**, v. 120, n. 4, p. 277 – 289, 2004.

NUNN P.; WILLIAMS B.; FLOYD K.; DYE C.; ELZINGA G.; RAVIGLIONE M. Tuberculosis control in the era of HIV. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 10, p. 819 – 826, 2005.

PABLO-MENDES A.; RAVIGLIONE M.C.; BATTAN R.; RAMOS-ZUNIGA R. Global surveillance for antituberculosis – drug resistance, 1994-1997. **N Eng J Med**, v. 338, n. 23, p. 1641 – 1649, 1998.

PADILLA E.; MANTEROLA J. M.; GONZÁLEZ V.; THORNTON C. G.; QUESADA M. D.; SÁNCHEZ M. D.; PÉREZ M.; AUSINA V. Comparison of the sodium hydroxide specimen processing method with the C18-carboxypropylbetaine specimen processing method using independent specimens with auramine smear, the MB/BacT liquid culture system, and the COBAS AMPLICOR MTB test. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 12, p. 6091 – 6097, 2005.

PALACI M.; DIETZE R.; HADAD D. J.; RIBEIRO F. K.; PERES R. L.; VINHAS S. A.; MACIEL E. L.; DO VALLE DETTONI V.; HORTER L.; BOOM W. H.; JOHNSON J. L.; EISENACH K. D. Cavitary disease and quantitative sputum bacillary load in cases of pulmonary tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 12, p. 4064 – 4066, 2007.

PALHARES M. C. A.; PLACCO A. L. N.; PORFÍRIO F. M. V.; BAPTISTA W.; SAEZ S. G.; TELLES M. A. S.; PALACI M. Baciloscopia após concentração com hipoclorito de sódio: um método específico e preditivo para o diagnóstico de tuberculose pulmonar em pacientes portadores de HIV/AIDS. **J Bras Patol**, v. 32, n. 3, p. 98 – 102, 1996.

PALOMINO J. C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **Eur Respir J**, v. 26, n. 2, p. 339 – 350, 2005.

PASCOPELLA L.; KELLAM S.; RIDDERHORF J.; CHIN D. P.; REINGOLD A.; DESMOND E.; FLOOD J.; ROYCE S. Laboratory reporting of tuberculosis test results and patient treatment initiation in California. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 4209 – 4213, 2004.

PEREIRA M. G. **Epidemiologia: teoria e prática**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 596 p.

PERERA J.; ARACHCHI D. M. The optimum relative centrifugal force and centrifugation time for improved sensitivity of smear and culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 93, p. 405 – 409, 1999.

PERKINS M. D. New diagnostic tools for tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 4, n. 12, p. S182 – S188, 2000.

PETERSON E. M.; NAKASONE A.; PLATON-DELEON J. M.; JANG Y.; DE LA MAZA L. M.; DESMOND E. Comparison of direct and concentrated acid-fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium* spp. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 11, p. 3564 – 3568, 1999.

ROBERTS G. D.; GOODMAN N. L.; HEIFETS L.; LARSH H. W.; LINDNER T. H.; McCLATCHY J. K.; MCGINNIS M. R.; SIDDIQI S. H.; WRIGHT P. Evaluation of the



TOMAN K. Tuberculosis: detección de casos y quimioterapia. **OPAS**, publicación científica N° 392, 1980.

TORTOLI E.; CICHERO P.; PIERSIMONI C.; SIMONETTI M. T.; GESU G.; NISTA D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. **J Clin Microbiol**, v.37, n. 11, p. 3578 – 3582, 1999.

VAN SOOLINGEN D.; VAN DER ZANDEN A.G.M.; HAAS P.E.W.; NOORDHOEK G.T.; KIERS A.; FOUORAINE N.A.; PORTAELS F.; KOLK A.H.J.; KREMER K.; VAN EMBDEN J.D.A. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. **J Clin Microbiol**, v. 36, p. 1840 – 1845, 1998.

VASANTHAKUMARI R. Concentrated sputum smear microscopy: a simple approach to better case detection in pulmonary tuberculosis. **Indian J Tuberc**, n. 35, p. 80 – 82, 1988.

WANG L.; TURNER M. O.; ELWOOD R. K. A meta – analysis of the effect of BCG vaccination on tuberculin skin test measurements. **Thorax**, v. 57, p. 804 – 809, 2002.

WARREN J. R.; BHATTACHARYA M.; DE ALMEIDA K. N.; TRAKAS K.; PETERSON L. R. A minimum 5.0 ml of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear for *Mycobacterium tuberculosis*. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, n. 5, p. 1559 – 1562, 2000.

WATTERSON S. A.; DROBNIOWSKI F. A. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. **J Clin Pathol**, v. 53, p. 727 – 732, 2000.

WAYNE L.G.; KUBICA G.P. **Genus Mycobacteria**. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 1436 – 1457, 1986.

WAYNE, L.G.; DOUBEK, J.R. Diagnostic key to mycobacteria encountered in clinical laboratories. **Applied Microbiology**, v.16, p. 925 – 931, 1968.

WHO. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing**. World Health Organization report 2008. Geneva, 2008.

WHO. **Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing.** Geneve: World Health Organization Publication: WHO/HTM/TB/2006.362. 2006, 250 p.

WHO. **Laboratory services in tuberculosis control.** Part I. Organization and Management. Geneva. Switzerland. WHO/TB/98.258. 1998.

WHO/IUATLD. **International Course on the Management of Tuberculosis Laboratory Networks in Low-Income Countries.** Ottawa, Canada, 2-13 October, 2000.

WILCKE J. T. R.; ASKGAARD D. S.; NYBO JENSEN B.; DOSSING M. Radiographic spectrum of adult pulmonary tuberculosis in a developed country. **Resp. Med**, v. 92, p. 493 - 497, 1998.

WILKINSON D.; STURM A. W. Diagnosing tuberculosis in a resource poor setting: the value of sputum concentration. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 91, p. 420 – 421, 1997.

WOLINSKY E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **Am Rev Respir Disease**, v. 119, n. 1, p. 107 – 159, 1979.

WOODS, G.L. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. **Infect Dis Clin North Am**, v.16, p. 127 – 144, 2002.

YASSIN M. A.; CUEVAS L. E. How many sputum smears are necessary for case finding in pulmonary tuberculosis? **Trop Med Int Health**, v. 8, n.10, p. 927 – 932, 2003.

YASSIN M. A.; CUEVAS L. E.; GEBREXABHER H.; SQUIRE S. B. Efficacy and safety of short-term bleach digestion of sputum in case finding for pulmonary tuberculosis in Ethiopia. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 7, n. 7, p.678 – 683, 2003b.