

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Ronaldo Rodrigues da Costa

Perfil de acometimento e avaliação de métodos de diagnósticos da tuberculose.

Montes Claros  
2012

Ronaldo Rodrigues da Costa

Perfil de acometimento e avaliação de métodos de diagnósticos da tuberculose.

Dissertação apresentação ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cuidado Primário em Saúde

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Coorientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Silva

Montes Claros

2012

C837p Costa, Ronaldo Rodrigues da.  
Perfil de acometimento e avaliação de métodos de diagnósticos da tuberculose [manuscrito] / Ronaldo Rodrigues da Costa. – 2012.  
75 f. : il.

Bibliografia: f. 73-74.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros -  
Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan.  
Coorientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Silva.

1. Tuberculose – Diagnóstico – Prevenção - Brasil. 2. *Mycobacterium tuberculosis* - Infecção. 3. Biologia molecular. 4. Epidemiologia. I. Bonan, Paulo Rogério Ferreti. II. Silva, Márcio Roberto. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Reitor: Professor João dos Reis Canela

Vice-reitora: Professora Maria Ivete Soares de Almeida

Pró-reitor de Pesquisa: Professor Vicente Ribeiro Rocha Júnior

Pró-reitor de Pós-graduação: Professor Osmar Pereira Oliva

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Professor Alfredo Maurício Batista de Paula

Subcoordenadora: Professora Ana Cristina de Carvalho Botelho



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



CANDIDATO (A): ) RONALDO RODRIGUES DA COSTA

TÍTULO DO TRABALHO: "Perfil de acometimento e avaliação de métodos de diagnósticos da tuberculose".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Doenças Infecciosas e Parasitárias

LINHA DE PESQUISA: Diagnostico Clínico e Terapêutico em Doenças Infecciosas e Parasitárias

**BANCA (TITULARES)**




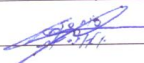
PROF. DR. PAULO ROGÉRIO FERRETI BONAN /ORIENTADOR(A)

PROF. DR. MÁRCIO ROBERTO SILVA (COORIENTADOR)

PROF. DR. FÁBIO RIBEIRO

PROF. DR. ANTÔNIO AUGUSTO FONSECA JÚNIOR

**ASSINATURAS**

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

**BANCA (SUPLENTE)**

PROF. DR. HERCÍLIO MARTELLI JÚNIOR

PROF. DR. MURILO GOMES OLIVEIRA

**ASSINATURAS**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

APROVADO(A)

REPROVADO(A)

Aos meus pais, Geraldo e Josina, responsáveis pela minha existência,  
por me educarem dando exemplo de caráter, honestidade e respeito ao próximo, com os  
princípios éticos de convivência em família,  
por abrirem as portas permitindo e incentivando meus estudos,

Aos meus irmãos e irmãs, cunhados e cunhadas, sobrinhos e sobrinhas,  
que sempre estiveram presentes e incentivando.

A minha esposa, Elisângela, pelo companheirismo, paciência, amor e carinho.  
A meus filhos, Gustavo e Vinícius pela minha ausência em determinados momentos.

A meu orientador, Professor Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan e  
a meu coorientador, Professor Dr. Marcio Roberto Silva  
pela contribuição neste trabalho, meus sinceros votos de agradecimento  
pela oportunidade, orientação, compreensão e confiança  
e ao Professor Doutorando Cláudio José Augusto por ter contribuído com os seus  
ensinamentos, mostrando a importância do tema micobacteriose no contexto da saúde pública,  
sendo um exemplo de profissionalismo a ser seguido no estudo e combate à tuberculose.

## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi realizada com a participação e apoio de algumas instituições dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

à Universidade Estadual de Montes Claros, pelo oferecimento do curso, na pessoa do professor Dr. Hercílio Martelli Júnior, coordenador desta turma de mestrado;

à Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, na pessoa do Dr. Flávio Dinis Capanema, que se empenhou com dedicação para a criação desta turma de mestrado;

ao Hospital Regional João Penido, na pessoa do Dr. Márcio Luiz Itaboraí e Dr Renado Lopes de Castro Lobo, pela liberação do espaço para a realização dos trabalhos práticos e minha liberação para a participação no mestrado;

à Universidade Federal de Juiz de Fora, em especial, ao laboratório desta instituição, na pessoa do professor Renê Gonçalves de Matos e Professor Dr. Murilo Gomes Oliveira pela liberação permitindo minha participação no curso;

e a FAPEMIG, pela parceria e apoio financeiro.

”Quando deixamos de aprender, envelhecemos.

O segredo da juventude eterna é a aprendizagem”



## RESUMO

Este estudo descritivo e transversal, objetivou determinar o perfil sócio-demográfico, clínico-epidemiológico, econômico e diagnóstico de pacientes portadores de tuberculose em hospital de referência no estado de Minas Gerais Hospital Regional João Penido). Também procurou avaliar fatores associados à caracterização bioquímica e molecular de micobactérias e comparar o desempenho destes métodos. Incluíram-se neste estudo, pacientes portadores de micobactérias promotoras da tuberculose confirmadas por métodos bioquímicos e/ou moleculares entre março de 2008 e fevereiro de 2010. De 175 casos, 170 tiveram perfil de *Mycobacterium tuberculosis*, dois coinfeção *M. tuberculosis*/complexo *M. avium*, dois complexo *M. avium* e um coinfeção *M. bovis*/*M. tuberculosis*. 75,4% acometeram pacientes do sexo masculino, com mediana etária de 40 anos, sendo 14,3% em HIV positivos e 32% com renda familiar baixa e muitos destes em moradia precária. A doença pulmonar foi observada em 94,9%. Desses, 45,1% se curaram, 24,0% abandonaram o tratamento e 9,7% vieram a óbito. A supervisão do tratamento ocorreu em 60% dos pacientes e em somente 56% foi realizado o diagnóstico para HIV. Das 9,6% amostras paucibacilares e 55,5% das extrapulmonares, o diagnóstico só foi possível após a realização da cultura do material biológico. Evidenciou-se também associação entre o esquema de tratamento e taxas de caracterização bioquímica. Percebeu-se também associação entre tempo de inativação do DNA e taxas de amplificação de micobactérias por PCR. Dos 175 casos, a maioria foi caracterizada por ambos os testes. A caracterização conjunta demonstrou um predomínio de *M. tuberculosis*, uma evidência de *M. bovis* e quatro de *M. avium*. Sendo três em pacientes HIV positivos, em um foi confirmada a forma disseminada da doença. Observou-se a predominância de casos de infecção por *M. tuberculosis*, com doença pulmonar, afetando adultos masculinos, com soropositividade para HIV pouco detectada e precárias condições socioeconômicas. A utilização da cultura foi uma importante ferramenta diagnóstica, complementar a baciloscopia. Demonstraram-se associações de variáveis explicativas relacionadas com as caracterizações bioquímicas e moleculares despertando a necessidade de estudos futuros mais controlados, com maior amostragem para confirmar de forma mais acurada a interferência do esquema antibiótico utilizado, se caso novo, ou recidiva sobre a caracterização bioquímica de micobactérias. Sugerem-se outras análises para definir a melhor combinação do binômio tempo/temperatura que favoreça a caracterização molecular de micobactérias por amplificação de genes de cópia única como *pncA*, *oxyR*, entres outros.

Palavras-chave: Tuberculose; Infecção por *Mycobacterium*; Diagnóstico; Epidemiologia; Biologia molecular; Löwenstein-Jensen; Reação da polimerase em cadeia; Brasil

## ABSTRACT

This cross-sectional descriptive study aimed to determine the sociodemographic profile, clinical, epidemiological and economic and diagnosis of tuberculosis patients in a referral hospital in the Zona da Mata of Minas Gerais State, Brazil. We also aimed to evaluate the factors associated with biochemical and molecular characterization of mycobacteria and compare the performance of these methods. Patients were included in this study, with *M. tuberculosis* promoters confirmed by biochemical and / or molecular differences between March 2008 and February 2010. Data collection was performed using two instruments with the medical records and patients. The study was approved by the Ethics Committee in Research of the Hospital Foundation of the State of Minas. In 175 cases, 170 were of *M. tuberculosis*, two *M. avium* complex, and two coinfection *M. tuberculosis* / *M. avium*, two *M. avium* and one coinfection *M. bovis* / *M. tuberculosis*. The higher prevalence of Tuberculosis (75.4% of cases) were in male patients, with median age of 40 years, and 14.3% were HIV positive and 32% with low family income, many of these in poor housing. Pulmonary disease was observed in 94.9%. These, 45.1% were cured, 24.0% abandoned the treatment and 9.7% died. Supervision of treatment occurred in 60% of patients and only 56% was achieved for HIV diagnosis. On 9.6% of paucibacillary specimens and 55.5% of extrapulmonary TB, the diagnosis was only possible after the completion of the culture of biological material. Of the 175 cases, most was characterized by both tests. Some samples had only biochemical, others only by the molecular characterization. The characterization joint showed a predominance of *M. tuberculosis*, one *M. bovis* and four *M. avium*. Being in three HIV-positive patients was confirmed in a disseminated form of the disease. In fact, this study showed a greater preference for adult male subjects with lung disease, patients with poor socioeconomic conditions, many without known positivity for HIV and treatment with partial supervision. The use of culture was an important diagnostic tool, complementary to smear. The associations of explanatory variables related to the biochemical and molecular characterization reveals the need for more controlled future studies with larger samples to confirm more accurately the interference of the antibiotic regimen used, if new case or relapse on the biochemical characterization mycobacteria. And others to define the best combination of binomial time

/ temperature favors the molecular characterization of mycobacteria by amplification of single copy genes as *pncA*, *oxyR*, set amidst others.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium*, Diagnosis, Epidemiology, Molecular Biology; Lowenstein-Jensen; polymerase chain reaction; Brazil

## LISTA DE SIGLAS

AAR	Álcool Ácido Resistente
SB	Stonebrink
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DOTS	Directly Observed Treatment Short Cours
E	Etambutol
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
H	Isoniazida
HEM	Hospital Eduardo de Menezes
HJK	Hospital Juscelino Kubitschek
HRJP	Hospital Regional João Penido
LJ	Löwenstein-Jensen
MAC	Complexo Mycobacterium avium
MDR	Multi-Droga Resistente
MIRU	Mycobacterial interspersed repetitive units
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
R	Rifampicina
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TB	Tuberculose
Z	Pirazinamida

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	21
3. PRODUTOS.....	22
3.1. Artigo Científico 1- Epidemiological, clinical and diagnosis of patients with tuberculosis in a public hospital in the Zona da Mata region of Minas Gerais State, Brazil -.....	23
3.2. Artigo Científico 2 - <i>Fatores associados à caracterização bioquímica e molecular de micobactérias</i> .....	41
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG.....	75

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública, principalmente na idade mais produtiva das pessoas, destruindo a vida de cidadãos mais frágeis socialmente. Acompanha o homem desde as civilizações mais antigas que deixaram registros. Seja em documentos encontrados ou estudos em múmias, a doença tem sido observada no passado dos povos de várias raças e nos diversos continentes (1,2). Seu agente etiológico *M. tuberculosis*, foi descoberto em 1882 por Robert Kock, que isolou e descreveu o bacilo conseguindo cultivá-lo e reproduzir a doença em animais de laboratório (3).

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales*, e a família *Mycobacteriaceae*. O gênero *Mycobacterium* inclui o complexo *M. tuberculosis*; o complexo *M. avium*; outras micobactérias e numerosas espécies saprófitas presentes no solo e na água. O complexo *M. tuberculosis* inclui as espécies: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedii*. O complexo *M. avium* inclui as espécies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. intracellulare*. (4).

Atualmente (2011), na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” do pesquisador J.P. Euzéby são citadas 154 espécies e 13 subespécies no gênero *Mycobacterium* spp. Muitas espécies foram incluídas a partir dos anos 2000 (5). São bastonetes retos ou levemente curvos com 0,2 - 0,7µm de diâmetro e 1,0 - 10 µm de comprimento; podem possuir ramificações; crescimento filamentosos ou micelias que se fragmenta em bastonetes ou cocos Álcool Ácido Resistente (AAR) em algum estágio do crescimento. Os componentes lipídicos da parede celular representam mais de 60% do peso seco. O fator corda da parede celular está relacionado com o crescimento colonial das bactérias virulentas (5).

A transmissão se dá de pessoa para pessoa pelo ar, através da emissão de gotículas contendo *M. tuberculosis*. Estas gotículas potencialmente infectantes são produzidas quando pessoas com tuberculose pulmonar ou de laringe tosse, espirram ou falam. Tem como principais sintomas: comprometimento do estado geral, tosse, inapetência, febre e emagrecimento. O período de incubação varia entre 6 e 12 meses após a infecção inicial (6). Os casos de TB ocorrem predominantemente no grupo etário economicamente mais produtivo com faixa etária entre 15 e 49 anos (4).

Apesar de o agente causador da tuberculose humana ser altamente infectante, sua capacidade em desenvolver doença clínica é relativamente baixa. Os fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença não foram totalmente elucidados, mas, de maneira geral, eles são atribuídos a uma relação entre fatores ambientais, características do hospedeiro e a fatores genéticos do patógeno (7). Fatores sociais como pobreza, desnutrição, estresse, superpopulação e exposição à micobactérias ambientais influenciam a susceptibilidade à TB, características típicas de nações em desenvolvimento (8). Entretanto, a imunossupressão causada principalmente pela infecção por HIV/AIDS tem sido apontada como um dos principais fatores desencadeadores da tuberculose. Enquanto a possibilidade de um indivíduo imunocompetente infectado pelo bacilo da TB desenvolver a doença é de cerca de 10% ao longo da vida, no indivíduo infectado pelo HIV e sem intervenção terapêutica essa probabilidade é de cerca de 10% ao ano (9). O aparecimento do HIV, modifica a epidemiologia da TB e dificulta seu controle. Por outro lado, é uma das primeiras complicações entre os infectados pelo HIV, devido à maior virulência do bacilo da tuberculose, independente do comprometimento significativo do sistema imunológico (1).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou a tuberculose como emergência global e, desde então, vem desenvolvendo políticas para o seu controle. A prevalência mundial da TB é de 12,0 milhões em 2010 (178/100 mil). No mundo, 8,8 milhões de novos casos (128/100 mil) e 1,4 milhões de mortes por tuberculose ocorreram em 2010, dos quais 350 mil casos (8% do total) e 200 mil mortes foram em pessoas HIV- positivas (10). O crescimento da população da Índia, China, Indonésia, África do Sul e Nigéria primeiro ao quinto posto, respectivamente, em termos de números absolutos de casos, tem impulsionado número de casos de TB comparados com os relatados pela OMS para anos anteriores. O continente africano tem a maior taxa de incidência per capita, 363 por 100.000 habitantes (10).

Houve uma aparente queda global no número de casos novos per capita desde 2003 em todas as seis regiões da OMS, exceto na Região Europeia onde as taxas são estáveis. Se esta tendência se sustentar, a incidência da tuberculose pode começar a inverter e as metas de desenvolvimento para o milênio podem ser alcançadas bem antes de 2015 (data definida para o alcance das metas estabelecidas pela OMS). Cinco entre seis regiões da OMS, com exceção da região africana, estão a caminho de reduzir pela metade as taxas de prevalência e morte por



TB em 2015 em comparação com níveis de 1990 (10). Em 1991, a Assembléia Mundial da Saúde estabeleceu, ainda, como meta para 2015 detectar pelo menos 70% dos novos casos com baciloscopia positiva em programa de Tratamento Diretamente Observado (DOTS) e tratar com sucesso, pelo menos, 85% dos casos detectados. As exceções ficam para as regiões africanas e a Europa que não estão no caminho certo para alcançar estes objetivos, seguindo grandes aumentos na incidência de TB na década de 1990. Isso devido às taxas do progresso destas regiões que impede que elas alcancem as metas que estão sendo alcançadas em nível mundial (11).

Aproximadamente 95% dos casos de tuberculose ocorrem em países em desenvolvimento, sendo que 22 países concentram 80% do total de casos (10). O Brasil está entre os principais países que registram esses casos, ocupando a 16<sup>a</sup> posição entre as regiões com a maior prevalência da doença, atingindo todas as faixas etárias. (12). Estima-se que no Brasil 92 mil (47/100 mil) casos de TB são notificados por ano, em torno de 5 mil (2,6/100 mil) mortes, incidência estimada de 85 mil (43/100 mil), incluindo pacientes HIV, a incidência de tuberculose em paciente HIV positivo é de 18 mil (9,3/100 mil) casos em 2010 (10).

A doença é sensível à ação dos profissionais, isso para a sociedade é uma vantagem, porém uma grande responsabilidade para os profissionais da saúde. Em função disto, é de fundamental importância que estes profissionais estejam preparados para atuar sobre ela. Devido à sua gravidade social, a tuberculose passou a ser enfrentada com Políticas de Saúde envolvendo a ação dos Estados Nacionais e dos Órgãos Internacionais na busca de seu controle. Portanto, diagnosticar e tratar o mais rápido possível a doença tornou-se a medida mais objetiva e eficaz para salvar vidas e resgatar a saúde das pessoas com esta doença (1).

Antes da introdução da estreptomicina, o diagnóstico da tuberculose era feito geralmente baseado nos sintomas clínicos, incluindo tosse, perda de peso e suores noturnos, pelo raio-X de tórax anormal, PPD e o achado de bacilos álcool-ácido resistentes no escarro. As culturas nem sempre eram obtidas, porque havia pouco a ser ganho pela recuperação do organismo. Com a introdução da estreptomicina, percebeu-se que a resistência podia desenvolver-se rapidamente, mas para ser capaz de detectar a resistência era necessário recuperar o microorganismo. À medida que aumentavam os diagnósticos por cultura, melhoramentos eram feitos nos procedimentos de digestão (preparação da amostra tornando o material biológico mais fluido) e concentração e nos meios de cultura. Muitas das culturas forneciam

cepas de micobactérias não tuberculosas que eram álcool-ácido resistentes, porém, tinham colônias e/ou outras características que as diferenciavam do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Dessa forma, o avanço no controle da tuberculose possibilitou o conhecimento de que parte das doenças atribuídas ao *Mycobacterium tuberculosis* era, na realidade, causada por micobactérias não tuberculosas (13).

Em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, a principal forma de diagnóstico de tuberculose humana é baseada na visualização direta do bacilo ao microscópio óptico (baciloscopia). A microscopia se por um lado é método rápido e barato, por outro lado, tem baixas sensibilidade (34% a 80%) e especificidade (14,15). São necessários, aproximadamente, 5.000 bacilos (14,16) a 10.000 bacilos (17,16) para que o teste seja positivo. Por sua vez, apesar de ser o padrão ouro para a confirmação diagnóstica da tuberculose, a cultura requer mais de três semanas para um diagnóstico definitivo, pela própria característica de replicação do *M. tuberculosis*, podendo, ainda, não informar qual membro do complexo *M. tuberculosis* foi o causador da doença, o que pode confundir o diagnóstico e a epidemiologia da doença (13,14).

A identificação das espécies pode ser alcançada pela caracterização clássica (caracterização bioquímica) e caracterização molecular de micobactérias.

**Na caracterização clássica** determina-se as características de cultivo e os perfis bioquímicos das cepas. a) Características de cultivo que incluem, morfologia colonial, tempo de crescimento e a produção de pigmento (18). b) Identificação bioquímica: utiliza-se resultados de diversas provas bioquímicas como, catalase à temperatura ambiente, catalase à 68 °C, niacina, nitrato, pirazinamidase, uréia e perfil no teste de sensibilidade a drogas (19).

Na Caracterização molecular as técnicas são baseadas na análise de polimorfismo do DNA após digestão por enzima de restrição (RFLP), RFLP seguido de hibridização com sondas (IS6110, elemento repetitivo rico em GC), *spoligotyping* e MIRU (Mycobacterial interspersed repetitive units) (20).

Vários fatores podem interferir tanto na caracterização bioquímica como molecular de microrganismos. No caso de micobactérias especificamente, acredita-se que o tipo ou esquema antibiótico utilizado pelo paciente e o tipo de entrada no serviço (se caso novo ou recidiva), que também está relacionado com o tipo ou quantidade de antibióticos já utilizados

pelo paciente, podem influenciar conjuntamente a caracterização bioquímica, por supostamente interferirem no metabolismo das micobactérias. Por outro lado, o binômio tempo-temperatura de inativação do DNA confirmadamente afeta as taxas de sua amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), principalmente em se tratando de genes de cópia única (21).

O termo TB faz referência à doença mais frequentemente causada pelo *M. tuberculosis*, mas que também pode ser devida a outras micobactérias tuberculosas como *M. bovis* ou *M. africanum*. Entretanto, outras micobactérias, chamadas de não tuberculosas, como as do complexo *Mycobacterium avium* (MAC), provocam enfermidades semelhantes à tuberculose, mas essas infecções não são contagiosas e a maioria delas não responde aos medicamentos que se revelam muito eficazes contra a tuberculose (22).

Em relação ao tratamento, a tuberculose é uma doença grave, porém curável, em praticamente 100% dos casos novos, desde que os princípios da quimioterapia sejam seguidos. Este deve ser feito em regime ambulatorial, supervisionado, no serviço de saúde mais próximo, na residência ou no trabalho do doente. As drogas usadas, nos esquemas padronizados, são: Isoniazida – **H**; Rifampicina – **R**; Pirazinamida – **Z** e Etambutol – **E**. Em agosto de 2008, o Comitê Técnico Assessor do Programa Nacional de Controle da Tuberculose, recomendou a inclusão do Etambutol, para adultos e adolescentes (>10 anos de idade), no tratamento de primeira linha da tuberculose no Brasil. Desse modo, está recomendado o uso de Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol na primeira fase do tratamento durante dois meses seguidos de Rifampicina e Isoniazida durante quatro meses, mantendo dessa forma o regime de curta duração de 6 meses. Para crianças (<10 anos de idade) continua a recomendação com 3 fármacos na 1ª fase (RHZ) e 2 fármacos (RH) na 2ª fase: A primeira **fase (ou de ataque)**, as 4 drogas preconizadas serão administradas em comprimidos compostos por dosagens fixas de Rifampicina (150mg), Isoniazida (75mg), Pirazinamida (400mg) e Etambutol (275mg). A segunda fase (**ou de manutenção**), as 2 drogas preconizadas serão administradas em comprimidos com dosagens fixas de Rifampicina (150mg) e Isoniazida (75mg) (23).

Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico de micobactérias, é importante que este seja feito por meio da cultura do espécime clínico. Além disso, a caracterização por métodos bioquímicos e/ou moleculares deve ser realizada principalmente em algumas situações como: formas paucibacilares da tuberculose pulmonar, formas extrapulmonares, para o diagnóstico

de micobacterioses, e nos serviços que recebam material para o diagnóstico de pacientes co-infectados com o vírus HIV (16), além dos casos de abandono de tratamento, recidiva, falência de tratamento e suspeita de MDR.

As micobactérias requerem métodos especiais para estudo, pois muitas crescem lentamente; outras necessitam de meios especiais na diferenciação das espécies, sendo tarefa geralmente realizada por especialista. As espécies de crescimento rápido (crescimento em menos de sete dias) podem ser identificadas com mais facilidade, enquanto que as de crescimento lento são mais difíceis, requerem mais de sete dias (24).

O Löwenstein-Jensen (LJ) é o meio de cultura rotineiramente utilizado para a recuperação de micobactérias. À base de ovo, este meio de cultura tem como fonte de carbono o glicerol que favorece o crescimento do *M. tuberculosis*, porém prejudica o crescimento do *M. bovis*. Para possibilitar o crescimento do *M. bovis* é importante que insira na rotina, meios de cultura como o Stonebrink que se diferencia do LJ por conter em sua fórmula o piruvato de sódio substituindo o glicerol como fonte de carbono favorecendo o crescimento do *M. bovis* (24).

A escolha de Minas Gerais para o presente estudo foi devido ao fato do Estado ocupar o 4º lugar em número absoluto de casos de tuberculose e 24% dos casos foram diagnosticados em unidades hospitalares (SINAN-TB-SES de MG). No Brasil 30 a 50% dos diagnósticos de TB são feitos no Hospital e 30% dos óbitos acontecem nos hospitais. A Rede FHEMIG é referência estadual no tratamento da tuberculose, nas Unidades HJK, HEM e HRJP, em nível secundário (ambulatório de especialidades: pneumologia e infectologia) e terciário.

Este trabalho foi realizado com dados secundários (banco de dados) de um projeto maior intitulado “**Frequência de *Mycobacterium bovis* (tuberculose zoonótica) nos casos humanos e estudos dos agentes por epidemiologia analítica e molecular**” (Projeto tuberculose zoonótica). O Projeto “tuberculose zoonótica” foi elaborado pela Embrapa Gado de Leite em parceria com diversas instituições dos setores saúde e agricultura. A parte dele que envolve pesquisas em seres humanos foi apresentada ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFJF e recebeu parecer favorável para execução (parecer de aprovação 166/2006, registro CEP/UFJF 819.125.2006, registro no SISNEP CAAE 1150.0.000.180-06) e da

FHEMIG (registro n° 52/08, CAAE: 0038.0.287.000-08).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de acometimento e avaliar possível ganho no diagnóstico da tuberculose com a utilização de cultivo, utilizando os meios Stonebrink e Lowenstein-Jensen em paralelo, e a inclusão de métodos bioquímicos e moleculares na caracterização de micobactérias.

### 2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar as espécies de micobactérias envolvidas em pacientes atendidos em um hospital de referência em tuberculose da Zona da Mata de Minas Gerais.

Determinar o perfil sócio-demográfico, clínico-epidemiológico e econômico desses pacientes portadores de micobactérias confirmadas por métodos bioquímicos e/ou moleculares.

Comparar o desempenho do método de cultura em relação ao de baciloscopia no diagnóstico de micobacterioses.

Avaliar possíveis fatores associados à caracterização bioquímica e molecular de micobactérias; e comparar o desempenho da caracterização bioquímica em relação à caracterização molecular de micobactérias.

### 3 PRODUTOS

3.1 Artigo Científico 1 - Epidemiological, clinical and diagnosis of patients with tuberculosis in a public hospital in the Zona da Mata region of Minas Gerais State, Brazil

Cadernos de Saúde Pública

3.2 Artigo Científico 2 - *Fatores associados à caracterização bioquímica e molecular de micobactérias*

Memórias Instituto Oswaldo Cruz

Artigo 1 Submetido em 08/04/2012 em: Cadernos de Saúde Pública (CSP\_0510/12)

Epidemiological, clinical and diagnostic features of tuberculosis

Epidemiological, clinical and diagnostic features of tuberculosis at Minas Gerais polo, Brazil

---

Ronaldo Rodrigues da Costa<sup>1,2</sup>, Marcio Roberto Silva<sup>3</sup>, Adalgiza da Silva Rocha<sup>4</sup>, Kelly Cristina Ferreira Abi-Zaid<sup>1</sup>, Andrea Padilha de Alencar<sup>5</sup>, Paulo Soares Filho<sup>5</sup>, Antônio Augusto Fonseca Junior<sup>5</sup>, Philip Noel Suffys<sup>4</sup>, Paulo Rogério Ferreti Bonan<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Regional Hospital João Penido. Fundação Hospitalar of Minas Gerais State, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>2</sup> Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup> Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>4</sup> Applied Molecular Biology to Mycobacteria Laboratory . Fiocruz. Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>5</sup> National Agricultural Laboratory, Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Pedro Leopoldo, MG, Brazil

<sup>6</sup> State University of Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil



## RESUMO

Este estudo descritivo e transversal objetivou determinar o perfil epidemiológico, clínico e diagnóstico de pacientes portadores de micobactérias entre março de 2008 e fevereiro de 2010, em Juiz de Fora, Minas Gerais. A coleta de dados foi feita junto aos prontuários médicos e pacientes. De 175 casos, 170 apresentaram *Mycobacterium tuberculosis*, dois *M. tuberculosis*/complexo *M. avium*, dois complexo *M. avium* e um *M. bovis*/*M. tuberculosis*. Setenta e cinco vírgula quarto por cento dos casos aconteceram em pacientes do sexo masculino, 14,3% em HIV positivos, 32% apresentavam renda familiar baixa e moradia precária. A idade mediana foi de 40 anos. A doença pulmonar ocorreu em 94,9%. Sobre os encerramentos do tratamento, 45,1% se curaram, 24,0% abandonaram o tratamento e 9,7% vieram a óbito. A supervisão do tratamento ocorreu em 60% dos casos e 56% tiveram o exame de HIV realizado. Em 9,6% dos espécimes de escarro e 55,5% dos extrapulmonares, o diagnóstico só foi possível pela cultura de micobactérias. A cultura de micobactérias foi uma importante ferramenta diagnóstica, complementar à baciloscopia.

Palavras-chave Tuberculose; Infecção por *Mycobacterium*; Diagnóstico; Epidemiologia; Biologia molecular.

## Abstract

This cross-sectional descriptive study aimed to determine the epidemiological, clinical and diagnosis profiles of patients with mycobacteria between March 2008 and February 2010, in Juiz de Fora, Minas Gerais State. Data collection was performed at the medical records and interviewing the patients. In 175 cases, 170 presented *Mycobacterium tuberculosis*, two *M. tuberculosis/M. avium* complex, two *M. avium* complex and one *M. bovis / M. tuberculosis*. The higher prevalence of Tuberculosis (75.4% of cases) were in male patients, with median age of 40 years old, 14.3% were HIV positive patients, 32% presented low family income and poor housing. Pulmonary disease occurred in 94.9%. About the tuberculosis treatment outcomes, 45.1% were cured, 24.0% were dropout and 9.7% died. Supervision of treatment occurred in 60% of cases and 56% was not tested for HIV. In 9.6% of sputum specimens and 55.5% of extrapulmonary specimens the diagnostic was only possible by mycobacterial culture. The use of mycobacterial culture was an important diagnostic tool, complementary to smear.

Keywords: Tuberculosis; Mycobacterium Infections; Diagnosis; Epidemiology; Molecular Biology.

## Introduction

Tuberculosis (TB) is a chronic transmissible bacterial disease caused by *M. tuberculosis*, a bacilli discovered by Robert Koch in 1882. This is a disease with compulsory notification <sup>1</sup>.

Tuberculosis was believed to be close to eradication, but in 1993 the World Health Organization (WHO), announced it as a global emergency, and since then has been developing policies for its control <sup>2</sup>. Factors such as poverty, malnutrition, stress, overcrowding and exposure to environmental mycobacteria have been associated with higher susceptibility to tuberculosis <sup>3</sup>. The risk of developing TB is estimated to be between 20-37 times greater in people living with HIV than among those without HIV infection. It was estimated that the risk of developing active TB among HIV and *M. tuberculosis* co-infected people was approximately 8% per year, compared to 10% risk throughout life-time for people infected solely with the bacillus <sup>4</sup>.

Currently, TB is one of the major public health challenges of the world. In 2010 the worldwide prevalence of the disease were 12 million cases (178/100,000), with 8.8 million new cases (128/100,000) <sup>5</sup>. In Brazil, it is estimated that 92,000 (47/100,000) TB cases are reported annually <sup>5</sup>. Sixty percent of the cases are in 315 of the 5,570 Brazilian municipalities, and TB is the seventh cost of hospitalization in Brazilian Unified Healthcare System (SUS) and the first cause of death among patients with HIV/AIDS <sup>6</sup>. Approximately 95% of tuberculosis cases occur in developing countries. There are 22 countries in the world, which constitute 80% of global tuberculosis cases. Brazil is occupying the 16<sup>th</sup> position among these 22 countries with the highest prevalence of TB <sup>5</sup>.

The State of Minas Gerais ranks the 4<sup>th</sup> position in the absolute number of TB cases and 24% of the cases were diagnosed in seven hospitals <sup>7</sup>. In Brazil, 30% to 50% of TB diagnoses were made at the hospital and 30% of TB deaths also occurred in hospitals. The Hospital Foundation of Minas Gerais (FHEMIG) network is a reference in tuberculosis treatment. The Juscelino Kubitschek Hospital (HJK), Eduardo de Menezes Hospital (HEM) and João Penido Regional Hospital (HRJP) compound this FHEMIG network <sup>8</sup>.

Therefore, the aim was to characterize the epidemiological, clinical status and diagnosis of tuberculosis patients at a referral hospital (HRJP) in the Zona da Mata region of Minas Gerais state, Brazil.

## Material and Methods

**Population, period and location.** This study included all patients with mycobacteria, whose cultures were positive for Acid-fast bacilli (AFB) and confirmed by biochemical and/or molecular methods of speciation. The patients included were greater than or equal to 17 years of age. The majority of patients were treated at HRJP. The study period was from March 2008 to February 2010. The HRJP is a public hospital in the Zona da Mata region of Minas Gerais, which attends a macroregion, providing services to SUS users. This hospital is capable of tertiary healthcare. It has 217 beds and is a reference in regional tuberculosis treatment.

**Ethical Aspects.** Confidentiality was assured and the study was approved by the Ethical Research Review Board of the FHEMIG (protocol 055/2011).

**Epidemiological data collection** Informations about possible related exposures were collected, using a general register of patients and two structured questionnaires. The first questionnaire was used to interview the study participants. The second was structured to obtain clinical and epidemiological informations, and to complete information obtained from notification records such as tuberculosis treatment outcome and results of HIV diagnostic tests. Both questionnaires had specific instruction manuals rigorously detailing the fill out procedures. A pilot study was conducted as a pre-test for the instruments through interviews with five pulmonary TB volunteers and two extra-pulmonary tuberculosis suspects. After analyzing the results, adjustments were made for some questions on the questionnaire or in some logistical aspects of the study. Potential study participants should have positive sputum smears and/or positive mycobacteria culture. The information for the establishment of these basic conditions was obtained in the public laboratory of tuberculosis diagnosis that performed sputum microscopy and/or culture (HRJP). The participants whether inpatients or outpatients, were approached at the beginning of treatment by a trained staff member who invited them to participate in the interview, to provide biological specimens for mycobacterial characterization and to collect blood for HIV testing. Basic information from all participants (interviewed or not) were recorded in the general register. The interview was conducted by a trained staff member in a closed room, to ensure the interviewee's privacy. After the interview a blood sample was collected for HIV testing from the participants gave their consent.

**Study variables.** The structured questionnaire used for interviewing participants and to complete clinical and epidemiological data encompassing various topics, allowing the definition of different variable groups, shown below:

**Sociodemographic and economic.** Gender, age, amount of the last monthly family income, city of residence, type of housing and whether had a current occupation.

**Clinical and epidemiological.** Patient care site; type of entry; TB clinical descriptions, presumptive type TB diagnosis; treatment regimen used, analyzed sample culture medium, if patients were referred from other institutions; directly observed treatment short course (DOTS); serological diagnosis of HIV, BCG vaccination, alcohol consume (defined as CAGE questionnaire result 3 to 4), current illegal drug usage and TB treatment outcome.

**Mycobacteria Culture; biochemical and molecular characterization.** Aliquots of sputum and other biological non-sterile samples were processed prior to culture, using decontamination techniques by the DARZINS method <sup>9,10</sup>. The sediments obtained were simultaneously inoculated in Löwenstein-Jensen (LJ) and Stonebrink (SB) media, and readings were performed at 7, 30, 45 and 60 days of incubation at 36.5 °C. Samples that showed no growth after 60 days were considered negative. Following bacterial growth the positive specimens were sent to the National Agricultural Laboratory (LANAGRO), Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, in Pedro Leopoldo, MG, according to bio-security standards to be submitted for classical characterization (phenotypic and biochemical).

**Data Analysis.** A cross-sectional analysis *of* all patients with mycobacteria, whose cultures were positive for AFB and confirmed by biochemical and/or molecular methods of speciation was carried out to describe the population included in the study. Epi Info was used for data entry and analysis <sup>11</sup>.

## **Results**

In the period between March 2008 and February 2010, 1000 specimens from TB patients or suspects were simultaneously cultured in both LJ and SB media. A total of 356 media grew positive cultures for AFB whether in LJ or SB media, approximately two isolates per patient. Figure 1 shows a flow chart from the total number of patients reported in the city (n=476) to those included in the study (n=175). In Juiz de Fora, during the period of study there were 476 reported cases of TB and mycobacterial infections. From this total, 357 (75%) were reported jointly by HRJP and the Specialized Clinics Unit (UCE). Of these, 241 (64.2%) were characterized as potential participants (positive AFB and/or positive culture) and their cultures were analyzed by biochemical and/or molecular methods. Of the potential participants, 216 (89.6%) were positive AFB smears and positive culture for mycobacteria and 25 (10.4%) were negative AFB smears and culture positive for mycobacteria. Of the 216 potential participants, 194 (80.5%) were analyzed. Of those tested, 175 (90.2%) had the mycobacteria characterized and 19 (9.8%) had inconclusive results for the species involved and were therefore excluded from the study. These 175 patients included in the study represent 72.6% of potential participants reported by the two health centers in the city over the period. Of the total included 154 (88.0%) were positive AFB smears and positive culture for mycobacteria and 21 (12.0%) presented negative AFB smears and positive culture for mycobacteria. Of these 175, 170 (97.2%) had at least one culture with a known *Mycobacterium tuberculosis* profile, 1 (0.6%) had a *M. bovis* profile by biochemical methods (not confirmed by molecular biology) and another sample from the same patient presented *M. Tuberculosis* profile; 2 (1.1%) showed a co-infection of *M. tuberculosis* and *M. Avium* complex profiles, and finally 2 (1.1%) only presented the *M. avium* infection profile.

Table 1 shows socio-demographic and economic characteristics of the population included in this study (n=175). Most patients (75.4%) were male with an average age of 40 years old and a minimum age of 17 years old. Most of the patients had incomes below two minimum wages per month, being that 58.3% lived in a house or apartment. Most respondents (85.1%) were residents in the city of Juiz de Fora. Patients younger than 17 years old were not included because the health services did not request to research this age group.

Table 2 shows clinical and epidemiological characteristics of the study population (n 175). One hundred and thirty-seven (78.3%) of the patients were recruited from the HRJP, while the majority of them were new cases (81.1%). Pulmonary TB had a higher prevalence (94.9%). Of the 175 patients 21 (12%) presented negative AFB smears and the presumptive

diagnosis of TB was possible only by a positive culture of specimen. About the treatment of TB, most of them, 165 (94.2%), underwent regimen I - basic. Regarding the sending of the strains for characterization, 92 (52.6%) and 83 (47.4%) were sent in Löwenstein-Jensen and Stonebrink mediums, respectively.

Notification records show that the majority 116 (66.2%) were not institutionalized. Notification records show also that 105 (60.0%) were referred to the DOTS. A significant portion 25 (14.3%) had positive diagnosis and 73 (41.7%) negative for HIV, but 77 (44.0%) did not undergo serological testing for diagnosis. The BCG vaccine mark was evident in less than 50% of the patients. Fifty seven (32.5%) were currently alcohol users (CAGE 3-4) and 35 (20.0%) were currently illegal drug consumers. Regarding the treatment outcomes, 42 (24.0%) abandoned, 17 (9.7%) died and 9 (5.1%) had no response to the TB treatment.

Table 3 shows that of 166 sputum samples 150 (90.4%) were diagnosed positive for AFB by sputum smears while among 9 specimens of the extra-pulmonary samples, 5 (55.6%) were diagnosed only by mycobacterial culture and 4 (44.4%) were positive AFB smears. There was more chance of a positive bacilloscopy in patient group with pulmonary tuberculosis than in the group with extra-pulmonary / pulmonary and extra-pulmonary (OR = 11.71, 95% IC 2.85 to 48.10).

## Discussion

A higher prevalence of TB in male patients was observed. A similar situation was observed by other authors<sup>12,13</sup>. In a study in Paris, the male gender was considered a risk factor for tuberculosis<sup>14</sup>. Oelemann et al<sup>15</sup>, in recent studies in Brazil, also had a higher prevalence of tuberculosis in males. Additionally, a significant proportion of the TB cases in the present study occurred among patients with HIV infection. HIV/AIDS increases the chances of tuberculosis occurrence among bacillus infected individuals<sup>4</sup>. The majority of the TB cases occurred in people with low family income, many of them living in shacks, rooms, prisons, streets, hostels or psychiatric hospitals. Furthermore, a considerable proportion of the patients were inveterate alcohol and illicit drug consumers. Unfavorable demographic and economic situations greatly increase the chances of an individual becoming ill from tuberculosis, and they also have lower chances of successful treatment<sup>3</sup>.

Some possible limitations of this study should be discussed. The proportion of extra-pulmonary patients included was lower than that reported by the city and pediatric and adolescent patients (less than 17 years old) were not included. Local physicians do not usually request direct AFB microscopy and mycobacterial cultures from children, adolescent and extra-pulmonary TB suspects. However, the Brazilian Ministry of Health recommends the cultivation as imperative for confirmation of extra-pulmonary TB suspects<sup>16</sup>.

Regarding the presumptive diagnosis of tuberculosis, this study shows the importance of carrying out cultures, because in the most extra-pulmonary samples diagnosis was only possible mycobacterial culture. This is mainly because to get a positive sputum smear it is necessary to have about 10,000 bacilli per mL of sputum while for culture results to show positive, it is enough to have just 10-100 bacilli per mL of specimen<sup>17</sup>.

The proportion of patients in this study who had supervised treatment (DOTS) was below the target set by the Brazilian Ministry of Health. In addition to the number of TB cases referred to DOTS being less than recommended, it is believed that some of them may have been erroneously classified as having received DOTS. The fact that the greater portion of patients had started treatment at a hospital may have erroneously included in the category of DOTS patients which had the supervised treatment strategy employed for less than that recommended period. Patients to be included in the category of DOTS should have had at least 24 and 48 direct observations of health professionals in the attack and maintenance phases of TB treatment, respectively<sup>18</sup>.



As for the serological diagnosis for HIV, this was accomplished in little more than half of the TB cases, below the goal set by the Brazil's National TB Control Program (NTCP) which is to offer HIV testing to 100% of adults with TB. This low rate of HIV testing reflects the lack of awareness among local health professionals about the importance of TB/HIV co-infection <sup>5</sup>.

Tuberculosis vaccination mark was verified, in less than half of the patients of this study, which could reflect a low rate of vaccination coverage. However, because the patients included were over 17 years old, this low coverage probably reflects an old situation from the past of NTCP. The importance of the BCG vaccine cannot be neglected by NTCP, because BCG prevents severe forms of TB such as tuberculous meningitis and miliary or systemic tuberculosis <sup>19</sup>.

The tuberculosis treatment outcomes among patients in this study, found that dropout and death rates from TB were higher than the local, state and national averages. This is probably due to the fact that the study was conducted among patients who underwent hospitalization. Hospitalized patients have more co-morbidities such as alcohol use, drugs or others that often lead to higher dropout rates and deaths compared to outpatients. Another study conducted in a regional referral hospital for tuberculosis in Minas Gerais State found a similar situation. The dropout rates were well above that recommended by the Brazilian Ministry of Health. The authors of that study argued that the high dropout rates might be linked to the fact that most cases were diagnosed in outpatients which had a previous hospitalization. The patients of that study after hospital discharge abandoned the treatment for a number of reasons among them the drug use, alcoholism and lack of family structure. Furthermore, the low health professional awareness and the absence of an structure that integrates clinical care and mycobacterial laboratory may be responsible for delay in diagnosis and thus reducing the healing possibility. Finally, this study also shows a considerable proportion of patients with TB associated to alcohol and drug use. These patients after hospital discharge should be directed at the DOTS treatment strategy to ensure the healing.

The majority (75%) of the TB and mycobacterial infections cases in the city included in this study were reported by two institutions, half by an outpatient clinic (UCE) and the other half by a regional referral hospital for TB (HRJP). This finding leads to some considerations. First, tuberculosis treatment decentralization has definitely not happened yet in Juiz de Fora. Second, the referral hospitals for tuberculosis still represent an important disease control place and should not be overlooked by health authorities, even after implementation of the

decentralization principles. Rather, the laboratories of these hospitals should be strengthened mainly in the complementary and differential diagnostics. One study found that approximately one third of reported TB patients were from the hospital level, which had no mycobacterial laboratory or coordinated activities for tuberculosis control <sup>20</sup>.

## ***Conclusion***

It was observed that the prevalence of TB was higher in male adults with pulmonary disease. Many patients presented poor socioeconomic conditions, absence of HIV testing and only partial DOTS.

Hospitals are an important strategy for TB control and they cannot be overlooked by health authorities. Furthermore, hospitalized patients with TB who have co-morbidities, such as alcoholism and drug use, after hospitalization, should be referred to the DOTS strategy to prevent abandonment and death from TB.

The importance of performing cultures for the presumptive tuberculosis diagnosis is evident in this study, since patients detected with extra-pulmonary tuberculosis; only half were identified through the cultivation of biological specimens.

In Brazil, it is recommended to expand the mycobacterial culture using conventional LJ in parallel with SB media, which favors the growth of *M. bovis*, from exclusively national and state TB referral centers also to macro-regional laboratories of TB. It is also necessary to introduce new and effective techniques for the rapid diagnosis of tuberculosis.

Finally, it is recommended that further studies be conducted including outpatient units, in order to have a representative sample of the population affected by tuberculosis in the studied region.

## **Contributors**

The authors participated in various stages of the study and contributed to the article. M. R. Silva and P. R. F. Bonan coordinated the field epidemiological studies, organized the databank and data analysis, and helped write the draft and reviewed the final version. R. R. da Costa performed sputum smears for AFB and mycobacterial cultures, analyzed the data, wrote the first draft, and revised the final version. A. da Silva Rocha, K. C. F. Abi-Zaid, A. P. Alencar, P. S. M. Filho, A. A. Fonseca Junior and P. N. Suffys conducted the laboratory analysis in isolates (conventional and molecular methods for mycobacterial speciation), participated in the data analysis, helped write the draft and reviewed the final version.

## References

- 1 Schuster M. Mycobacterial disease: a historical and epidemiologic perspective. *Clin Dermatol* 1995; 13(3):191.
- 2 Hijjar MA, Gerhardt G, Teixeira GM e Procópio MJ. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. *Rev Saúde Pública* 2007; 41(Supl. 1):50-58.
- 3 Baptista IM, Oelemann MC, Opromolla DV et al.. Drug resistance and genotypes of streins of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency vírus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(8):1147-52.
- 4 Antonucci G, Girardi E, Raviglione MC, Ippolito G. Risk Factors for tuberculosis in HIV-infected persons. A prospective cohort study. *The Gruppo Italiano di Studio Tubercolosi e AIDS (GISTA)* 1995; 274(2):143-8.
- 5 World Health Organization. Global Tuberculosis Control. TB prevalence surveys: a handbook [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011. [cited 2011Dez 15]. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548168\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548168_eng.pdf).
- 6 World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2008. [cited 2011 Dez 28]. Available from: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/pdf/fullreport.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/pdf/fullreport.pdf).
- 7 Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. Manejo Hospitalar da Tuberculose. Belo Horizonte: Secretaria de Estado da Saúde; 2009.
- 8 Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde; 2009.
- 9 Egons Darzins MD. The Bacteriology of Tuberculosis. *Library of congress, University of Minnesota, United States of America* 1958.
- 10 OPS (Organización Panamericana de la Salud), 1973. Manual de Bacteriología de la Tuberculosis, Técnicas y Procedimientos Básicos. Washington, D.C.: OPS.
- 11 Dean AG et al. 1994. Epi Info Version 6, Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, GA.
- 12 Santos LC. Caracterização molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia-GO, pela técnica de RFLPIS6110 [dissertação]. Goiânia (GO): Universidade Federal de Goiás; 2008.

- 13 Alves SLA et. al.. Clinical data and molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from drug-resistant tuberculosis patients in Goiás, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(6):655-661.
- 14 Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D et al.. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2):486-92.
- 15 Oelemann MC, Fontes AN, Pereira MA et al.. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Community health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(4):455-62.
- 16 Ministério da Saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde; 2009.
- 17 Vieira FD. Análise de uma metodologia para caracterização de proficiência de leitores de baciloscopia para a tuberculose [dissertação]. Manaus (AM): UFAM; 2005.
- 18 Ministério da Saúde. Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde; 2011.
- 19 Ministério da Saúde. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: Centro de Referência Professor Hélio Fraga/Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia; 2002.
- 20 Froes GC et. al.. Perfil e seguimento dos pacientes portadores de *Mycobacterium sp.* Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. *J Pneumol* 2003; 29(6).

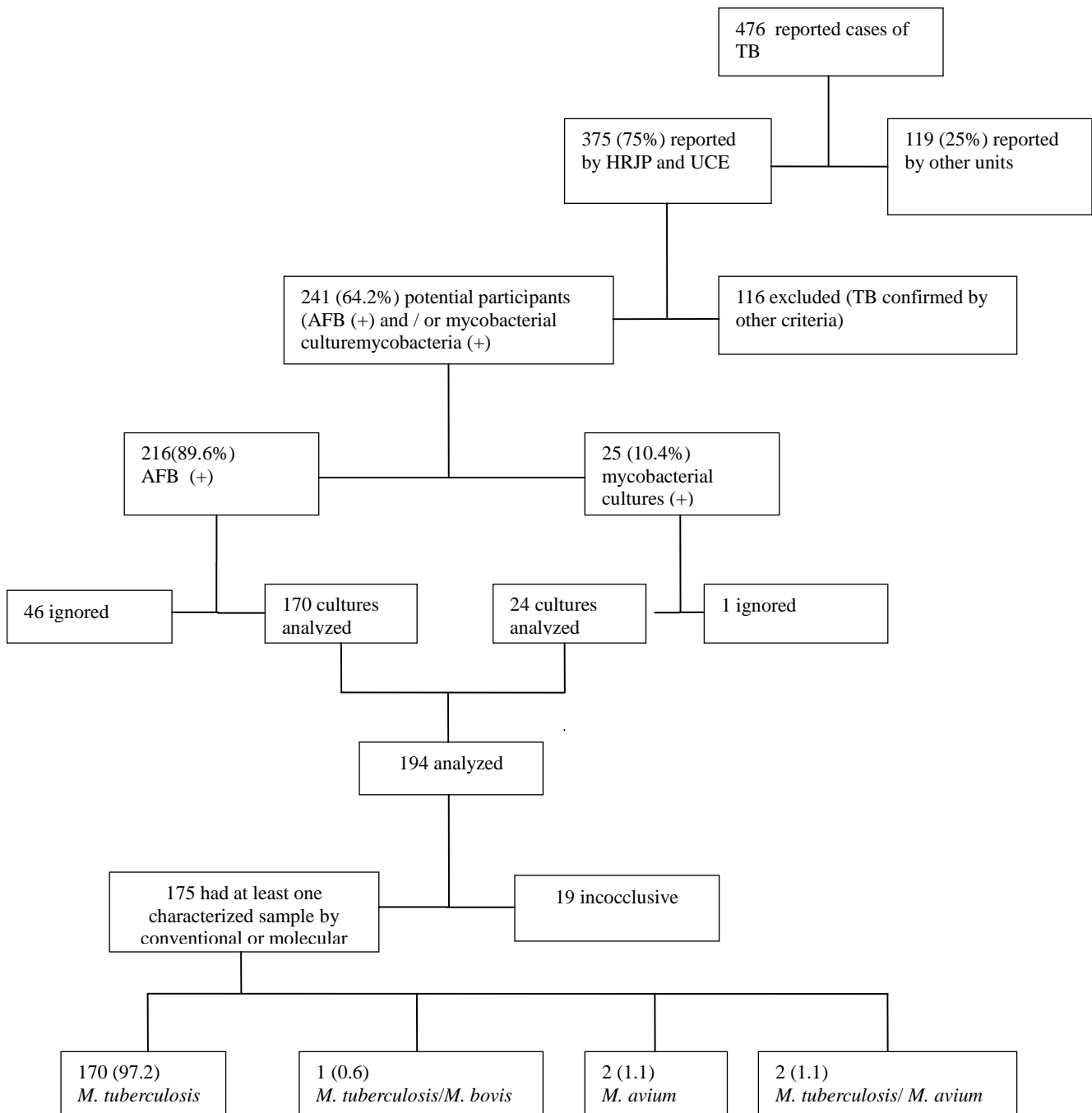


Figure 1 - Selected population (n=175) from the total reported cases of TB and frequency of *Mycobacterium avium* in patients analyzed in Juiz de Fora, from March 2008 - February 2010. TB, tuberculosis; HRJP, João Penido Hospital; UCE, Specialized Clinics Unit; AFB, Acid-Fast-Bacilli.

Table 1 – Socio-demographic and economic characteristics of the study population (n=175), March 2008 to February 2010

Characteristic	n(%)
Sex	
Male	132 (75.4)
Female	43 (24.6)
Age	
≤ 40 years	89 (50.9)
> 40 years	86 (49.1)
Monthly family income	
≤ 1.9 times the minimum wage	56 (32.0)
> 1.9 times the minimum wage	52 (29.7)
Ignored	67 (38.3)
City of residence	
Juiz de fora	149 (85.1)
Other cities	22 (12.6)
Ignored	4 (2.3)
Type of housing	
Shack / room / prison / street / hostel / psychiatric hospital	22(12.6)
House / apartment	102 (58.3)
Ignored	51 (29.1)
Current job	
Not working / has never worked	52 (29.7)
Yes	65 (37.2)
Ignored	58 (33.1)

Table 2 - Clinical and epidemiological characteristics of the study population (n= 175), March 2008 to February 2010

Characteristic	n(%)
Recruitment location	
HJP <sup>1</sup>	137 (78.3)
UCE <sup>2</sup>	38 (21.7)
Type of entry into service	
New case	142 (81.1)
Recurrence / Re-entry after abandonment	29 (16.6)
Ignored	4 (2.3)
Clinical presentation	
Pulmonary	166 (94.9)
Extra-pulmonary / Pulmonary and extra-pulmonary	9 (5.1)
Type presumptive diagnosis	
Positive sputum smears	154 (88.0)
Negative sputum smears	21 (12.0)
Treatment regimen used	
Regimen I - Basic (RHZ) <sup>3</sup>	165 (94.2)
Regimen IR (RHZE) / Regimen III (SZEET) <sup>4</sup>	6 (3.4)
Ignored	4 (2.4)
Growth media of the analyzed sample	
Löwenstein-Jensen	92 (52.6)
Stonebrink	83 (47.4)
Institutionalization	
Yes(prison, asylum, psychiatric hospital, hostels)	19 (10.9)
No	116 (66.2)
Ignored	40 (22.9)
DOTS	
Yes	105 (60.0)
No	46 (26.3)
Ignored	24 (13.7)
Serological diagnosis for HIV	
Positive	25 (14.3)
Negative	73 (41.7)
Ignored	77 (44.0)
	Continued



Table 2 - Clinical and epidemiological characteristics of the study population (n= 175), March 2008 to February 2010(continuation)

Characteristic	n(%)
Vaccine – BCG	
No marks	32 (18.3)
In doubt	10 (5.7)
Mark evident	71 (40.6)
Ignored	62 (35.4)
Alcohol Abuse (CAGE 3 – 4) <sup>5</sup> in the last year before starting treatment	
Yes	57(32.5)
No	70(40.0)
Ignored	48(27.5)
Current uses illegal drugs	
Yes	35 (20.0)
No	88 (70.3)
Ignored	52(29.7)
Treatment outcome	
Healing	79 (45.1)
Abandonment	42 (24.0)
Death from tuberculosis	17(9.7)
Death from other causes	1(0.6)
Transfer	17(9.7)
Another addition to the principal diagnosis Tuberculosis	3(1.7)
Failure	9(5.1)
In treatment	3(1.7)
Ignored	4(2.4)

<sup>1</sup>João Penido Regional Hospital<sup>2</sup> Specialized Clinics Unit<sup>3</sup> Rifampicin, isoniazid and pyrazinamide<sup>4</sup> Rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol; Streptomycin, pyrazinamide, ethambutol and ethionamide<sup>5</sup> CAGE questionnaire is an internationally used assessment instrument for identifying problems with alcohol. 'CAGE' is an acronym formed from the italicised letters in the questionnaire (cut-annoyed-guilty-eye).

Table 3 - Relationship of pulmonary and extra-pulmonary samples that screened positive by the sputum smear, Juiz de Fora, Minas Gerais, in March 2008 to February 2010

Clinical Presentation	Results of the sputum smears for AFB <sup>1</sup>	
	Positive	Negative
Pulmonary	150(90.4%)	16(9.6%)
Extra-pulmonary (5) / Pulmonary and extra-pulmonary (4)	4(44.5%)	5(55.5%)

Chi-square = 17.04 (p-value < 0.01)

<sup>1</sup> ACID- FAST- BACILLI

### 3.2 Artigo Científico 2

Caracterização de micobactérias

Variáveis explicativas associadas à caracterização bioquímica e molecular de micobactérias\*

---

Ronaldo Rodrigues da Costa<sup>1,2</sup>, Marcio Roberto Silva<sup>3</sup>, Adalgiza da Silva Rocha<sup>4</sup>, Kelly Cristina Ferreira Abi-Zaid<sup>1</sup>, Andrea Padilha de Alencar<sup>5</sup>, Paulo Soares Filho<sup>5</sup>, Philip Noel Suffys<sup>4</sup>, Antônio Augusto Fonseca Junior<sup>5</sup>, Marina de Oliveira Issa<sup>5</sup>, Paulo Rogério Ferreti Bonan<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Hospital Regional João Penido. Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. Juiz de Fora, MG, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

<sup>3</sup> Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG, Brasil

<sup>4</sup> Laboratório Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias. Fiocruz. Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>5</sup> Laboratório Nacional Agropecuário. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Pedro Leopoldo, MG, Brasil

<sup>6</sup> Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

---

\* Suporte financeiro: CNPq (410595/2006-3)

## RESUMO

Esse estudo descritivo e transversal objetivou avaliar variáveis explicativas associadas à caracterização bioquímica e molecular de micobactérias e comparar o desempenho destas metodologias em amostras de pacientes portadores de micobactérias entre março de 2008 e fevereiro de 2010. Evidenciou-se por meio de um modelo de regressão logística multivariada associação entre a variável explicativa “esquema de tratamento” e o evento “taxas de caracterização bioquímica”. A análise multivariada revelou também associação entre as variáveis explicativas “tempo de inativação do DNA”, “taxa de contaminação das amostras” e o evento “taxas de amplificação de micobactérias por PCR”. Dos 175 casos, a maioria foi caracterizada por ambos os testes. A caracterização conjunta demonstrou um predomínio de *M. tuberculosis*, uma evidência de *M. bovis* e quatro de *M. avium*. Os pacientes que apresentaram *M. avium* eram HIV positivos sendo, em um deles, confirmada a forma disseminada da doença. Demonstrou-se associações de variáveis explicativas relacionadas com as caracterizações bioquímicas e moleculares como a interferência do esquema antibiótico utilizado, se caso novo, ou recidiva sobre a caracterização bioquímica de micobactérias. Além disso, outros estudos devem ser realizados para definir a melhor combinação do binômio tempo/temperatura que favoreça a caracterização molecular de micobactérias por amplificação de genes de cópia única como *pncA*, *oxyR*, entres outros.

Palavras-chave: Tuberculose; Infecção por Micobactérias; Diagnóstico; Biologia molecular; Reação da polimerase em cadeia; Brasil.

## ABSTRACT

This cross-sectional descriptive study aimed to assess factors associated with biochemical and molecular characterization of mycobacteria and compare the performance of these methods in samples of patients with mycobacteria between March 2008 and February 2010. It was evidenced by a multivariate logistic regression model the association between the explanatory variable "treatment plan" and the event "rates of biochemical characterization." Multivariate analysis also revealed an association between the explanatory variables "time of inactivation of DNA," "rate of contamination of samples" and the event "rates of mycobacteria by PCR amplification." Of the 175 cases, most was characterized by both tests. The characterization joint showed a predominance of *M. tuberculosis*, *M. evidence M. bovis* and four *M. avium*. The patients with *M. avium* were HIV positive, being one of them confirmed the disseminated form of the disease. It were demonstrate associations of explanatory variables related to the biochemical and molecular characterization like interference of the antibiotic regimen used and if it is a new case or relapse on the biochemical characterization mycobacteria. Moreover, other studies could be performed to define the best combination of binomial time / temperature that improve favors the molecular characterization of mycobacteria by amplification of single copy genes as *pncA*, *oxyR*, set amidst others.

Keywords: Tuberculosis; Mycobacteria; Diagnosis; Biochemical; Molecular Biology; Polimerase chain reaction; Brazil.

## INTRODUÇÃO

A microscopia direta após coloração por Ziehl-Neelsen, em busca de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), é um método rápido e barato no diagnóstico da tuberculose. No entanto, tem baixas sensibilidade e especificidade (Bollela et AL. 1999). Por outro lado, apesar de ser o padrão ouro para a confirmação diagnóstica da tuberculose, a cultura requer mais de três semanas para um diagnóstico definitivo, e não informa qual espécie está causando a doença (Bollela et al. 1999; Koneman 2001). Além disto, a cultura ocorre principalmente em meios convencionais como Löwenstein-Jensen (LJ) ou Ogawa contendo glicerol (sem suplemento de piruvato), que prejudicam o isolamento de *M.bovis* (Da Silva Rocha 2010) Este agente zoonótico foi encontrado no Brasil em 3,5% (7/200) dos casos de tuberculose analisados (Corrêa e Corrêa 1974). Em Juiz de Fora, o *M. bovis* em co-infecção com *M. tuberculosis* foi detectado em 3 (1,5%) dos 191 casos (IC95% = 0 - 3,3%), que tiveram as micobactérias caracterizadas por métodos bioquímicos e/ou moleculares (Silva 2011).

O advento da AIDS resultou em um aumento da incidência de micobactérias do Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) e tem sido reconhecido como uma das infecções bacterianas oportunistas mais comuns causando, sobretudo, doença disseminada em indivíduos infectados pelo HIV (Oliveira et al. 2002 e Saada 1997).

Acredita-se que fatores como o tipo ou esquema antibiótico utilizado pelo paciente e o tipo de entrada no serviço (se caso novo, ou recidiva), que também está relacionado com o tipo ou quantidade de antibióticos já utilizados pelo paciente, podem influenciar conjuntamente a caracterização bioquímica de micobactérias, por supostamente interferirem em seu metabolismo. Por outro lado o binômio tempo-temperatura de inativação do DNA confirmadamente afeta as taxas de sua amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), principalmente em se tratando de genes de cópia única (EMBRAPA 2007).

Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar possíveis variáveis explicativas associadas à caracterização bioquímica e à caracterização molecular de micobactérias comparando o desempenho da caracterização bioquímica em relação à caracterização molecular.

## MATERIAL E MÉTODOS

**População incluída, período e local do estudo.** No presente estudo, foram incluídos todos os pacientes portadores de micobactérias (n=175), cujas culturas positivas para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) foram confirmadas por métodos bioquímicos e/ou moleculares para determinação da espécie da micobactéria envolvida. Os pacientes incluídos tinham idade maior ou igual a 17 anos. A maioria dos pacientes foi atendida no HRJP. O período do estudo foi de março de 2008 a fevereiro de 2010. O HRJP é um hospital público da zona da mata mineira, que atende a uma macroregião, prestando serviços a usuários do Sistema Único de Saúde. Este hospital tem capacidade terciária de atendimento. Possui 217 leitos e é referência no tratamento da tuberculose na região.

**Aspectos Éticos.** O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas (CEP/FHEMIG) sob o registro nº 055/2011, FR-443231, CAAE 0036.0.287.000-11).

**Isolamento primário de micobactérias.** Amostras de escarro de todos os pacientes, suspeitos de tuberculose foram utilizadas para cultivo e caracterização completa da micobactéria envolvida até espécie. De forma similar, amostras provenientes de suspeitos de tuberculose extrapulmonar com indicação de cultivo, foram também incorporadas na nova rotina de caracterização completa das micobactérias implicadas.

As alíquotas de escarro e de outras amostras biológicas não estéreis foram processadas previamente ao cultivo, utilizando técnicas de descontaminação (Método de DARZINS (OPS 1973)). Os sedimentos obtidos foram semeados simultaneamente em meio LJ e Stonebrink (SB), e realizadas leituras aos 7, 30, 45 e 60 dias de incubação à 36,5 °C. Somente foram considerados sem crescimento de micobactérias os meios que permaneceram incubados por no mínimo 60 dias sem nenhuma colônia característica, segundo recomendações de outros autores (Drobniewski; Strutt; Smith; Magee; Flanagan 2003).

Esta etapa de isolamento inicial de micobactérias ocorreu no laboratório do Hospital Regional João Penido/FHEMIG. Os tubos de LJ e SB em que foram comprovados o desenvolvimento de colônias características de micobactérias (BAAR positivas) foram encaminhados ao Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO, Pedro Leopoldo, MG, seguindo normas de biossegurança, para serem submetidas à caracterização clássica (bioquímica e fenotípica). Esse laboratório, vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento, é referência nacional no estudo de tuberculose bovina (*M. bovis*) e possui nível III de segurança.

**Caracterização clássica de micobactérias.** No LANAGRO, foram determinadas as características de cultivo e os perfis bioquímicos das cepas. a) Características de cultivo: morfologia colonial, características de crescimento. (DAVID, 1994). b) Identificação bioquímica: foram utilizados resultados de diversas provas bioquímicas e interpretadas de acordo com metodologias padronizadas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (KENT, 1985). Os principais testes realizados foram: catalase à temperatura ambiente, catalase à 68°C, niacina, nitrato, pirazinamidase, uréia e perfil no teste de sensibilidade a drogas.

Crítérios foram utilizados para a definição dos resultados bioquímicos quanto a sua conclusão:

- Amostras de micobactérias tuberculosas que tiveram resultados conclusivos pela bioquímica, mesmo que não tiveram amplificação positiva por PCR, foram consideradas conclusivas.
- Todas as micobactérias não-tuberculosas pela bioquímica (n = 4) foram obrigatoriamente comprovadas pela amplificação para que os resultados bioquímicos fossem considerados conclusivos.

Os testes bioquímicos para confirmação das espécies de micobactérias foram interpretados conforme estabelecido por Kent (1985) e apresentado resumidamente no Quadro 1.

**Inativação de micobactérias.** Uma réplica de cada amostra de micobactéria caracterizada no LANAGRO foi inativada pelo calor (Van Embden et al. 1993), com algumas adaptações no binômio tempo-temperatura de inativação e enviada ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias, Fiocruz, para caracterização molecular.

**Caracterização molecular de micobactérias.** Micobactérias com perfil de não-tuberculosas pela bioquímica (n = 4) foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) no Lanagro, para confirmação, além de também ser encaminhada uma réplica inativada à Fiocruz para serem testadas em outras provas moleculares.

Micobactérias com um perfil de não tuberculosas por testes bioquímicos (1 com perfil de *M. bovis* e 4 com perfil de *M. Avium*) foram submetidas a uma reação em cadeia da polimerase específica (PCR). DNA específico de *M. avium* foi confirmado pelos seguintes pares de primers ACG GGA GGG CAT CGT CGC CGA G e CGT TGG CGG CGG GCT TGT AGT GC (reverso), que foram projetados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil, seguindo outras recomendações prévias, a reação foi realizada com um



volume final de 20µL contendo tais concentrações de reagentes: 10 pmol de cada primer (IDT, EUA), 1,5 U de Taq Go Hot start (Promega, EUA), 20% de Green Go Taq 5X (Promega, EUA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega, EUA), 10 mM de dNTP buffer e 2µL de DNA (OIE, 2008). Condições de temperatura e tempo foram estabelecidas: desnaturação de 95 ° C por 5 minutos, 35 ciclos de 95 ° C por 35seg, 65 ° C por 35seg e 72 ° C por 35seg, seguido por uma temperatura de extensão de 72 ° C por 5 minutos. Um fragmento de 437bp foi amplificado. As bandas geradas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2% e visualizadas por fluorescência de brometo de etídio.

Na Fiocruz, as réplicas inativadas de todos os cultivos foram submetidas à extração de DNA, amplificação e detecção do polimorfismo no gene *pncA* (por análise de restrição). Para extração do DNA, utilizou-se o método CTAB (brometo de cetil trimetil amônio)/NaCl (Van Embden et al. 1993).

Um processo em dois passos foi usado para caracterizar micobactérias tuberculosas e distinguir possíveis *M. bovis* do restante do complexo *M. tuberculosis*: a) amplificação do gene *pncA* (Scorpio & Zhang 1996) e detecção de seu polimorfismo por enzimas de restrição (Barouni et al. 2004). b) amplificação do pseudogene *oxyR* e detecção de seu polimorfismo por análise de restrição (Sreevantsan et al. 1996).

Foram utilizados critérios para a definição quanto à conclusão dos resultados moleculares:

- Amostras de culturas inativadas com perfil de *M. tuberculosis* na bioquímica que tiveram amplificação e restrição de genes específicos de micobactérias tuberculosas foram consideradas conclusivas na análise molecular. Caso, contrário, foram inconclusivas.
- Um único paciente teve amostra com perfil bioquímico de *M. bovis* não foi confirmado por biologia molecular. Por ser um evento raro a tuberculose zoonótica, preferiu-se excluí-la da análise estatística que considerá-la inconclusiva na análise molecular.
- Amostras de culturas que se contaminaram por fungo após o isolamento de micobactérias, quando tiveram genes de *M. tuberculosis* amplificados foram consideradas conclusivas na análise molecular. Caso contrário, foram consideradas inconclusivas, já que estas amostras contaminadas tiveram suas replicas não contaminadas comprovadas como *M. tuberculosis*.
- Todas as amostras com perfil de não tuberculosas pela bioquímica foram confirmadas por amplificação de genes específicos para serem consideradas conclusivas na análise molecular.

**Coleta de dados relativos à exposição.** Na investigação, para avaliar possíveis exposições relacionadas, foram coletadas informações, utilizando-se um cadastro geral dos pacientes e dois questionários estruturados. O primeiro questionário foi utilizado para

entrevistar os participantes do estudo. O segundo foi estruturado de forma a obter dados clínicos; de conclusão dos diagnósticos para tuberculose e sorológicos para HIV; de encerramento dos casos; bem como para completar informações contidas nos arquivos de notificação.

Ambos os questionários possuíam manuais de instrução específicos, detalhando rigorosamente os procedimentos para seus preenchimentos. Foi realizado um estudo piloto com pré-teste dos instrumentos por meio de entrevistas com cinco voluntários com TB pulmonar e dois suspeitos de tuberculose extrapulmonar. Após análise dos resultados, foram feitas adequações em algumas perguntas do questionário ou em alguns aspectos logísticos do estudo.

Os potenciais participantes do estudo foram definidos a partir das seguintes condições básicas necessárias: possuir baciloscopia positiva e/ou cultivo positivo para micobactérias. As informações para o estabelecimento dessas condições básicas eram obtidas no laboratório público de diagnóstico de tuberculose que realizava baciloscopia e/ou cultivo (Hospital Regional João Penido).

Os potenciais participantes, internados ou ambulatoriais, foram abordados no início do tratamento por um membro da equipe capacitado que os convidava a participar da entrevista, a disponibilizar espécimes biológicos para caracterização e a coletar sangue para exame de HIV.

**Variáveis do estudo.** O questionário estruturado utilizado para entrevistar os participantes e completar dados clínico-epidemiológicos abrangia vários tópicos, de forma a possibilitar a definição de diversos grupos de variáveis como resultados bioquímicos e moleculares, sócio-demográficas, epidemiológicas e clínicas. As perguntas utilizadas no questionário foram validadas por outros estudos nacionais (Projeto ATAR e Pessoas, ambos da UFMG) ou internacionais (questionário CAGE).

#### **Modelo explicativo para a caracterização bioquímica de micobactérias:**

**Evento (variável independente):** Como evento do modelo explicativo para a caracterização bioquímica de micobactérias foi considerado o resultado da caracterização bioquímica (conclusivo ou inconclusivo)..

**Variável explicativa principal.** O tipo de entrada no serviço, o esquema de tratamento usado e o número de dias de tratamento antibiótico até a coleta da amostra para isolamento da micobactéria possivelmente envolvida foram consideradas as principais variáveis explicativas para a caracterização bioquímica de micobactérias.

### **Modelo explicativo para a caracterização molecular de micobactérias**

**Evento (variável independente):** Como evento para o modelo explicativo da caracterização molecular de micobactérias por PCR foi considerado o resultado da caracterização molecular (conclusivo ou inconclusivo).

**Variável explicativa principal.** A contaminação de culturas após o isolamento e o binômio tempo-temperatura de inativação do DNA foram consideradas como as principais variáveis explicativas que poderiam interferir na amplificação de genes específicos para caracterização de micobactérias.

**Análises dos dados.** Apenas uma amostra de cada paciente foi escolhida aleatoriamente visando garantir a independência das observações nas análises estatísticas.

A prevalência de todos os casos de *M. bovis* e de micobactérias não-tuberculosas na população estudada foi determinada. O numerador foi definido como casos de *M. bovis* e de micobactérias não-tuberculosas e o denominador como todos os casos de TB e micobacterioses caracterizados até espécies por métodos bioquímicos e/ou moleculares.

A avaliação de possíveis fatores associados à conclusão de diagnósticos de micobactérias realizados por métodos de caracterização bioquímica e moleculares foi realizada por meio de dois modelos explicativos.

O Epi Info foi o software utilizado para a realização da análise dos dados. Quanto às análises univariadas, diferenças de proporção foram verificadas por meio do teste de qui-quadrado. O nível de significância considerado foi de 0,05. A estimativa da magnitude das associações foi feita por meio do *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança a 95%.

Nas análises multivariadas, o efeito independente das variáveis explicativas foi avaliado por meio do modelo logístico. Para a modelagem foram considerados os resultados da análise univariada ( $p \leq 0.20$ ) e aspectos epidemiológicos (caso de variáveis que possuam uma indicação substantiva para inclusão no modelo). A partir do modelo saturado, as variáveis não-significativas ( $p > 0,05$ ) e que não possuam uma indicação substantiva (importância epidemiológica, por exemplo) para continuarem no modelo foram retiradas uma a uma até que o modelo ficasse com todas as variáveis significativas ( $p \leq 0.05$ ). A importância de cada variável no modelo foi avaliada pelo teste de Wald e a adequação do modelo final foi avaliada por meio do teste Hosmer-Lemeshow e graficamente por meio da distribuição dos resíduos.

Finalmente, foi realizado também um estudo de distribuição de frequências da confirmação da caracterização de micobactérias por métodos bioquímicos e moleculares.

## RESULTADOS

A distribuição dos pacientes e sua caracterização sócio-demográfica encontra-se na Tabela 1, descrita no artigo 1.

**Caracterização bioquímica de micobactérias:** A Tabela 2 mostra os resultados da caracterização de micobactérias na população do estudo ( $n = 175$ ). A caracterização bioquímica, isoladamente, identificou uma amostra com *M. bovis*, porém, não confirmada pela caracterização molecular. Esta amostra cresceu apenas em meio Sb talvez pelo fato de que o meio em questão possuir piruvato de sódio em vez de glicerol, que é favorável ao crescimento do *M. bovis*. De 175 pacientes que tiveram micobactérias caracterizadas, um teve a micobactéria caracterizada com perfil de *M. bovis* somente por bioquímica. Os demais pacientes, quando se tratava de *M. tuberculosis*, a caracterização foi por bioquímica e/ou molecular (PCR e análise de restrição) e nos casos de perfil bioquímico de *M. avium*, todos foram confirmados também por biologia molecular (PCR).

**Modelo explicativo para a caracterização bioquímica de Micobactérias:** A Tabela 3 mostra os resultados da análise univariada com possíveis variáveis explicativas para a caracterização bioquímica. Tipo de entrada no serviço e esquema de tratamento usado, isoladamente, tiveram associação ( $p < 0,05$ ) com a caracterização bioquímica. Pacientes casos novos que estavam sendo tratados no esquema I básico tiveram mais chances de caracterização pelo método bioquímico em comparação com o grupo de pacientes oriundos de reingressos após abandono/recidivas OR = 3,79 (IC95% = 1,38 – 10,30). Também, foi percebida associação ( $p \leq 0,05$ ) entre algumas variáveis explicativas entre si. Por exemplo: entre esquema de tratamento e tipo de entrada no serviço; dias de tratamento e esquema de tratamento e dias de tratamento e tipo de entrada no serviço. Como essas variáveis explicativas estavam altamente correlacionadas, quando incluídas num modelo multivariado as associações com o evento desapareciam devido a essa alta correlação. Em parte as proporções de caracterização bioquímica conclusivas encontradas, foi construída uma variável estratificada que levasse em conta características comuns a essas três variáveis, chamada “A) Esquema de tratamento estratificada por dias de tratamento”. Esta variável teve associação ( $p < 0,05$ ) com a caracterização bioquímica. Pelo menos, o grupo de falência ou usando o esquema I reforçado teve 19,5 (IC95% = 3,13 – 121,87) vezes mais chance de resultados inconclusivos na bioquímica que os pacientes que não tiveram nenhum tratamento até a coleta da amostra (Tabela 4). Como verificou-se, aparentemente, que dias de tratamento não era o

fator principal interferindo na caracterização bioquímica, visto que as duas faixas de “recidiva/reingresso após abandono” tiveram proporções de caracterização semelhantes ( $p > 0,05$ ) essas faixas foram unificadas. Com o mesmo princípio, decidiu-se unir as faixas sem tratamento e a de esquema I (até 10 dias de tratamento), por perceber que as proporções de caracterização dessas duas faixas foram também semelhantes ( $p > 0,05$ ). A variável resultante desta simplificação “B) Esquema de tratamento estratificada por dias simplificado” também apresentou associação ( $p < 0,05$ ) com a caracterização bioquímica. Os grupos recidiva/reingresso (esquema I) e falência/esquema I reforçado apresentaram respectivamente 4,25 (IC95% = 1,24-14,52), 20,40 (IC95% = 3,31-125,45) vezes mais chance de resultados inconclusivos na bioquímica que o grupo sem nenhum tratamento ou que usava o esquema I até 10 dias de tratamento (Tabela 4)

**Modelo explicativo para a caracterização molecular de Micobactérias:** Os dados da Tabela 5 mostram na análise univariada que o binômio tempo/temperatura de inativação, teve associação com a caracterização molecular ( $p < 0,05$ ). Amostras inativadas por 60 minutos a 84,5 graus (OR=10,90; IC95% 1,33 – 88,99) ou por 70 minutos a 84,0° (OR=12,53; IC95% 2,35 – 66,72) apresentaram mais chances de amplificação do gene específico para micobactérias comparado com amostras inativadas durante 40 minutos a 84,1 graus. O meio de crescimento também teve associação ( $p < 0,05$ ) com caracterização molecular. Amostras cultivadas em meio Löwenstein-Jensen apresentaram mais chances de amplificação comparadas às que cultivadas em meio Stonebrink OR = 2,74 (IC95% = 1,11 – 6,75). Assim como a contaminação das culturas teve associação com a caracterização molecular OR = 2,61 (IC95% = 0,84-8,12).

Dados das análises multivariadas (Tabela 6) mostraram que as variáveis “Contaminação da Cultura” e “tempo/temperatura de inativação permaneceram associadas ( $p < 0,05$ ) com a proporção de caracterização molecular conclusiva. As culturas que não contaminaram apresentaram mais chance de resultados moleculares conclusivos OR = 5,42, (IC95% = 1,35 – 21,79). Os grupos de amostras inativadas a 84,5 graus por 60 minutos e a 84,0 graus por 70 minutos apresentaram chances de resultados moleculares conclusivos respectivamente maiores OR = 14,51 (IC95% = 1,65 – 127,70) e OR = 12,53 (IC95% = 2,35 – 66,72) que os inativados a 84,1 graus por 40 minutos.

**Comparação dos métodos de caracterização de Micobactérias:** Dos 175 conhecidamente positivos para micobactérias, 157 (89,71%) tiveram amostras submetidas tanto a testes bioquímicos como moleculares. Dos 157, 117 (74,52%) foram caracterizadas por ambos os testes; 21 (13,37%) foram caracterizadas por testes moleculares e 19 (12,10%)

foram caracterizadas por testes bioquímicos. Finalmente, 18 (10,28%) dos 175 tiveram contaminação. Dentre os contaminados, 13 (72,22%) tiveram caracterização conclusiva por biologia molecular (Tabela 7).

As tabelas 8 e 9 mostram a comparação de concordância entre os métodos de caracterização somente das amostras dos pacientes que foram submetidas a ambos os testes diagnósticos. Notar que a sensibilidade da caracterização bioquímica conclusiva tomando a caracterização molecular como padrão foi alta e vice-versa. Tomando a caracterização molecular como referência, a bioquímica teve um aproveitamento de 84,81% na caracterização bioquímica, (IC95% = 80,56 - 89,05). Por outro lado, tomando a caracterização bioquímica como referência, a análise molecular teve um aproveitamento na caracterização de 86,66% das (IC95% = 82,32 - 90,79), ou seja, os métodos são complementares entre si para concluir diagnósticos inconclusivos pelo outro. Entretanto, verifica que 13 pacientes somente tiveram amostras caracterizadas pela biologia molecular, porque estavam contaminadas e não puderam ser submetidas a testes bioquímicos (Tabela 7). A caracterização conjunta (bioquímica e/ou molecular) demonstrou que 170 (97,1%), 1 (0,6%), 2 (1,2%) e 2 (1,2%) tiveram as micobactérias caracterizadas como *M. tuberculosis*, co-infecção *M. bovis* – *M. tuberculosis*, *M. avium* e co-infecção *M. avium* – *M. tuberculosis*, respectivamente.

**Prevalência de espécies de micobactérias encontradas:** A caracterização conjunta (bioquímica e/ou molecular) demonstrou que 170 (97,1%), 1 (0,6%), 2 (1,2%) e 2 (1,2%) tiveram as micobactérias caracterizadas como *M. tuberculosis*, co-infecção *M. bovis* – *M. tuberculosis*, *M. avium* e co-infecção *M. avium* – *M. tuberculosis*, respectivamente.

*M. bovis* em co-infecção com *M. tuberculosis* foi detectado em 1 (0,6%) dos 175 casos, que tiveram as micobactérias caracterizadas apenas por métodos bioquímicos não sendo possível a caracterização molecular. Este paciente TB pulmonar BAAR positivo teve uma cultura que cresceu apenas em meio SB caracterizada com o perfil de *M. bovis* por provas bioquímicas. A cultura apresentou teste de catalase à temperatura ambiente negativo, teste de catalase à 68 °C negativo, teste de niacina negativo, teste de nitrato negativo, teste de pirazinamidase negativo e teste de uréia positivo. Houve caracterização inconclusiva pela biologia molecular (uma amostra de cultura inativada por processo termogênico não amplificou o gene *pncA* e pseudogene *oxyR*).

## DISCUSSÃO

**Modelo explicativo para a caracterização bioquímica de Micobactérias.** Este trabalho evidenciou associação entre o esquema de tratamento antibiótico utilizado/tipo de entrada no serviço e as taxas conclusivas de caracterização bioquímica. Aparentemente houve uma interferência do antibiótico usado no tratamento ou da situação de entrada no serviço (reingresso após abandono/recidiva, falência, etc) sobre o metabolismo micobacteriano da micobactéria isolada, que aparentemente pode interferir na caracterização bioquímica. Esse fato deve ser avaliado com mais cuidado pelas autoridades de saúde e setores de diagnóstico bioquímico e fenotípico de micobactérias (Cardoso 2008).

**Modelo explicativo para a caracterização molecular de Micobactérias.** Este trabalho evidenciou também a associação entre a contaminação de micobactérias após o isolamento e do tempo de inativação do DNA (já que as temperaturas de inativação foram mantidas aproximadamente inalteradas) com evento “amplificação do material genético de micobactérias por PCR”. Um maior tempo de inativação parece ter levado a maiores taxas de amplificação de DNA. A explicação parece estar em possibilitar uma maior lise das membranas celulares e promover uma maior exposição do material genético a ser extraído e amplificado (EMBRAPA 2007).

Diversos fatores podem afetar a extração do DNA e sua posterior amplificação. Primeiro, quanto maior o tempo de inativação, maior a degradação da estrutura da bactéria e liberação do DNA. A micobactéria tem uma estrutura muito difícil de ser quebrada e, muitas vezes, mesmo se inativada, isso não significa que a parede foi destruída e todo o DNA foi liberado. Possivelmente, quanto mais tempo exposta ao calor, mais é destruída, mais enzimas e proteínas (inclusive aquelas que podem estar ligadas ao DNA, tornando-o indisponível) são desnaturadas (Comunicação pessoal de Antônio Augusto Fonseca Junior 2011).

Os ensaios de amplificação de PCR muitas vezes não funcionam quando é adicionada à reação, DNA da amostra em excesso, este problema pode ser resolvido fazendo a diluição da amostra. Por outro lado, desnaturação ineficiente pode ser evitada, também, aplicando altas temperaturas de desnaturação (94-95°C) e desnaturação entre 30 e 60 segundos (Sachse, 2004). Este mesmo autor mostra o efeito da temperatura de anelamento na especificidade da amplificação. Utilizando diferentes temperaturas (50, 54, 57 e 60°C) observou-se que a temperatura de 60°C obteve melhores resultados que as demais (Sachse 2004)

Em outro estudo, a amostra foi submetida a 30 ciclos de amplificação com duração de um minuto cada temperatura de desnaturação de 94°C e anelamento à 72°C (Carvalho 2003)

Outro autor comparou três técnicas de obtenção de DNA: **Técnica clássica**, a extração ocorreu a 80°C por 20 minutos, sendo refrigeração por 2 horas, e depois o material foi armazenado a -20°C; **Termólise**, a 96°C por 10 minutos, congelado a -20°C por no mínimo 2 horas, até que ocorresse congelamento (importante para causar a ruptura das células, e novamente incubada a 96°C por 10 minutos, conservado congelado a -20°C até o momento do uso; **Aplicação da cultura líquida diretamente nos tubos de PCR**, a cultura foi aplicada diretamente na mistura reativa para PCR, servindo como fonte de DNA para a reação. Neste trabalho verificou-se que todas as técnicas utilizadas na comparação, direcionadas à técnica de MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*), produziram bons resultados, ficando a escolha da técnica por conta da praticidade e do custo (Pandolfi 2006).

Aparentemente há uma falta de padronização do binômio tempo/temperatura de inativação nas técnicas de inativação de micobactérias por extração de DNA. Entretanto, os resultados do presente estudo mostram que ao menos o tempo de inativação teve uma interferência significativa na amplificação do DNA.

**Diagnóstico de micobactérias e métodos de caracterização:** Dos 175 conhecidamente positivos para micobactérias, a grande maioria das amostras foram submetidas, tanto a testes bioquímicos como moleculares. A maioria foi caracterizada por ambos os testes; No entanto algumas amostras tiveram apenas caracterização bioquímica, outras, apenas caracterização molecular. Porém, algumas amostras que contaminaram tiveram caracterização conclusiva somente por biologia molecular (13 em 18 amostras). Como estavam contaminadas não puderam ser abertas no laboratório de bioquímica para evitar contaminação cruzada do ambiente de trabalho por fungos presentes nos tubos. A contaminação, por outro lado, não afetou excessivamente as taxas de caracterização molecular de micobactérias, mostrando que esta seria uma alternativa para caracterização de amostras contaminadas (Tabela 7). No Brasil, o método de diagnóstico mais utilizado para tuberculose é a baciloscopia (Zielh-Neelsen). Em geral a cultura do gênero *Mycobacterium*, sua identificação e testes de sensibilidade são realizados, em casos específicos, apenas em centros de referência em TB, em geral. A importância da realização de cultivo fica evidente neste estudo uma vez que dos pacientes com tuberculose extrapulmonar detectados, a metade somente foi identificada por meio de cultivo. Por outro lado, as análises moleculares constituíram-se em alternativas para caracterização de amostras contaminadas. Sugere-se adicionalmente expandir a cultura de micobactérias utilizando-se meios convencionais em paralelo com algum que favoreça o crescimento de *M. bovis* (como SB ou LJ contendo piruvato) para laboratórios macrorregionais, além dos centros nacionais e estaduais de referência em TB.



**Prevalência de espécies de micobactérias encontradas:** A caracterização conjunta (bioquímica e/ou molecular) demonstrou que a maioria das micobactérias foram caracterizadas como *M. tuberculosis*. No entanto é importante ressaltar que observaram uma evidência de *M. bovis* e quatro evidências de *M. avium*. Dentre estas, três delas, foram em pacientes HIV positivos e, em apenas um deles, foi solicitada hemocultura que confirmou a forma disseminada da doença, evento comum em pacientes HIV positivos (Sagarika et al. 2011). Um outro estudo mostra que em pacientes imunocompetentes a forma disseminada da TB foi diagnosticada em apenas 3,2% dos pacientes, enquanto que em pacientes HIV positivos este percentual subiu para 11,6%, reforçando a importância da investigação da forma disseminada da TB em pacientes HIV positivos (Sanches 2012). As evidências de envolvimento de micobactérias não tuberculosas encontradas principalmente em pacientes em tratamento para AIDS, sendo confirmada em um deles a forma disseminada de micobacteriose, chama a atenção dos serviços envolvidos com o atendimento de pacientes infectados por HIV/AIDS para a importância de não somente solicitar o cultivo, mas também a caracterização micobacteriana em algumas situações em que micobactérias não tuberculosas sejam suspeitas. Isto facilitaria a escolha da terapia adequada direcionada a micobacterioses para esse grupo de pacientes em que essas micobactérias ainda apresentam prognóstico desfavorável, apesar do avanço dos anti-retrovirais. A porcentagem de casos extrapulmonares/pulmonares e extrapulmonares de TB incluídos foi de 9 (5,1%) em 175, portanto, menor que a encontrada de 30% na totalidade de casos notificados nos últimos anos no município. Isto poderia subestimar a proporção de outras micobacterioses na população, visto que estas são supostamente mais encontradas em casos extrapulmonares de TB. Como a maioria dos casos de tuberculose extrapulmonar é diagnosticada no município por histopatologia, provavelmente aconteceu uma diminuição do número de culturas solicitadas para esclarecimento de casos extrapulmonares destas amostras.

## CONCLUSÃO

As associações de possíveis variáveis explicativas relacionadas com as caracterizações bioquímicas e moleculares, demonstradas por este estudo evidenciaram a interferência do esquema antibiótico utilizado, do tipo de entrada no serviço (se caso novo ou recidiva) sobre a caracterização bioquímica de micobactérias. Além disso, também outros estudos são necessários para definir qual a melhor combinação do binômio tempo/temperatura de forma a favorecer a caracterização molecular de micobactérias por amplificação de genes de cópia única como *pncA*, *oxyR*, entres outros.

## REFERÊNCIAS

- Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MT, Zanini MS, Salas CE 2004. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes* 18:167-70.
- Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL 1999. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo 33:281-286.
- Cardoso AM 2008. Aspectos Epidemiológicos e Sanitários relacionados Micobactérias. Micobactérias Atípicas e Saúde Pública. UFG. Goiânia.
- Carvalho WS 2003. Low-Stringency Single-Specific-Primer PCR as a Tool for Detection of Mutations in the *rpoB* Gene of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 41:3384-6.
- Corrêa CNM, Corrêa WM 1974. Tuberculose Humana por bacilo bovino em São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biol* 41:131-134.
- Cosivi O et al. 1998. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerg Infect Dis* 4:59-70.
- Da Silva Rocha A et al. 2010. N. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. *Tuberculosis*. [Epub ahead of print].
- David H, Brum L, Prieto E 1994. Manual de Micobacteriologia em Saúde Pública - Princípios e Métodos. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- Drobniewski F, Strutt M, Smith G, Magee J, Flanagan P 2003. Audit of scope and culture techniques applied to samples for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* by hospital laboratories in England and Wales. *Epidemiol Infect* 130:235-237.
- EMBRAPA Pecuária Sudeste 2007. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de Reação em cadeia da polimerase [recurso eletrônico] Márcia Cristina de Sena [ET AL.] – São Carlos .
- Fonseca Júnior AAr 2011. Divisão de Biossegurança, Laboratório Nacional Agropecuário: LANAGRO/MG. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicação pessoal.
- Kent PT, Kubica GP 1985. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, JUNIOR WCW 2001. Diagnóstico microbiológico. In: Micobactérias, Medsi 903-946.
- OIE. Office International des Epizooties. World Animal Health. Part I. Paris, France: OIE; 1998.

Oliveira EMD, Morais ZM, Tabata R et al. 2002. Avaliação da virulência em hamsters (*Mesocricetus auratus*) de estirpes de *Mycobacterium avium* presentes na população de suínos do sul do Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 39:202-207.

OPS 1973. Manual de Bacteriología de la Tuberculosis, Técnicas y Procedimientos Básicos. Washington (DC): OPS.

Ordoñez PT 1999. Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* a partir de amostras de expectoração de pacientes humanos com problemas respiratórios crônicos. Cuajimalpa: *vet México* 30:227-229.

Pandolfi JRC 2006. Otimização da técnica de MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) para o estudo epidemiológico de pacientes com tuberculose [tese]. Araraquara: [s.n.] 81 f. il.

Saada MHF et al 1997. Analysis of *Mycobacterium avium* complex serovars isolated from AIDS patients from southeast Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:471-475.

Sachse K 2004. Specificity and Performance of PCR Detection Assays for Microbial Pathogens. *Molecular Biotechnology* 26:61-79.

Sagarika H et al. 2011. Improved laboratory diagnosis of tuberculosis e The Indian experience *Tuberculosis* 414 - 426.

Sanchez M et al. 2012. Outcomes of TB Treatment by HIV Status in National Recording Systems in Brazil, 2003–2008. *PLoS ONE* 7(3).

Scorpio A, Zhang Y 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 2: 635-6.

Silva MR et al. 2011. Identificação de *Mycobacterium tuberculosis* complexas baseadas em amplificação e seqüenciamento do *oxyR* pseudogene de manchas armazenados Ziehl-Neelsen manchada de escarro no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [online]106:09-15.

Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, Gillies DA, Siddiqui S, Khalaf CN, Kreiswirth BN, Bifani P, Adams LG, Ficht T, Perumaalla VS, Cave MD, van Embden JDA, Musser JM. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2007–2010.

Van Embden JDA et al. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendation for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31:406-409.

Vieira, FD2005. Análise de uma metodologia para caracterização de proficiência de leitores de baciloscopia para a tuberculose [dissertação]. Manaus, AM: UFAM.

Quadro 1 – Critérios de interpretação de testes bioquímicos para definição do perfil de micobactérias

Testes bioquímicos						Perfil
Catalase à temperatura ambiente	Catalase à 68 °C	Niacina	Nitrato	Pirazinamidase	Uréia	
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>M. tuberculosis</i>
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	<i>M. bovis</i>
Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	<i>M. avium</i>

Tabela 1 - Características clínico-epidemiológicas da população do estudo (n = 175), março 2008 a fevereiro de 2010

Características	n(%)
Tipo de entrada no serviço	
Caso novo	142 (81,1)
Recidiva/Reingresso após abandono	29 (16,6)
Ignorado	4 (2,3)
Forma clínica	
Pulmonar	166 (94,9)
Extrapulmonar/Pulmonar e extrapulmonar	9 (5,1)
Tipo de diagnóstico presuntivo	
Baciloscopia positiva	154 (88,0)
Baciloscopia negativa	21 (12,0)
Esquema de tratamento utilizado	
Esquema I - básico (RHZ)	140 (80,0)
Recidiva/Reingresso - Esquema I - básico (RHZ)	20 (11,4)
Falência (5)/Esquema IR (SZEET)	6 (3,4)
Ignorado	9(5,2)
Meio de crescimento da amostra analisada	
Löwenstein-Jensen	92 (52,6)
Stonebrink	83 (47,4)
Tempo e Temperatura de inativação	
(40min/84,1°C)	45 (26,3)
(40min/84,1°C)	45 (26,3)
(60min/84,5°C)	31 (18,2)
(70min/84,0°C)	50 (29,2)
DOTS (indicação de tratamento supervisionado)	
Sim	105 (60,0)
Não	46 (26,3)
Ignorado	24 (13,7)
Diagnóstico sorológico para HIV	
Positivo	25 (14,3)
Negativo	73 (41,7)
Não realizado	77 (44,0)

Tabela 2 - Resultados da caracterização de micobacterias população do estudo, (n = 175), março 2008 a fevereiro 2010

Características	n (%)
<b>Caracterização bioquímica</b>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	129 (82,2)
<i>M. avium</i> /Co-infecção <i>Mtb.</i> - <i>M. Avium</i>	4 (2,5)
Co-infecção <i>M. tuberculosis</i> – <i>M. bovis</i>	1 (0,6)
Caracterização inconclusiva	23 (14,7)
<b>Caracterização molecular</b>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	145 (83,3)
<i>M. avium</i> (2)/Co-infecção <i>Mtb.</i> - <i>M. avium</i> (2)	4 (2,3)
NA* (caracterização inconclusiva)	25 (14,4)
<b>Caracterização conjunta</b>	
<i>M. avium</i>	2 (1,1)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	170 (97,2)
Co-infecção <i>M. tuberculosis</i> – <i>M. avium</i>	2 (1,1)
Co-infecção <i>M. tuberculosis</i> – <i>M. bovis</i>	1 (0,6)

Tabela 3 - Análise univariada da caracterização bioquímica, Juiz de Fora, Minas Gerais , março 2008 a fevereiro de 2010

Variáveis	Total	Caracterização bioquímica		p-valor
		Pos (%)	OR(IC95%)	
<b>Sexo</b>				
Masculino	119	100(84,0)	1	0,44
Feminino	37	33(89,2)	1,57(0,49-4,93)	
<b>Idade</b>				
≤ 40anos	83	74(89,2)	1,95(0,78-4,81)	0,14
> 40anos	73	59(80,8)	1	
<b>Renda familiar mensal</b>				
≤ 1,9 salários mínimos(2)	49	41(83,5)	1,14(0,37-3,44)	0,81
> 2,0 salários mínimos(1)	48	41(85,4)	1	

Continua

Tabela 3 - Análise univariada da caracterização bioquímica, Juiz de Fora, Minas Gerais, março 2008 a fevereiro de 2010 (continuação)

Variáveis	Caracterização bioquímica			p-valor
	Total	Pos (%)	OR(IC95%)	
<b>Município de residência</b>				
Juiz de Fora(2)	134	115(85,8)	1,61(0,48-5,38)	0,43
Outros municípios(1)	19	15(78,9)	1	
<b>Tipo de moradia</b>				
Barraco/quarto/presídio/rua/alberque/hospital psiquiátrico	21	19(90,5)	1,87(0,39-8,89)	0,42
Casa/apartamento	91	76(83,5)	1	
<b>Possui trabalho atual</b>				
Não trabalha/nunca trabalhou	44	38(86,4)	0,80(0,26-2,40)	0,69
Sim	61	51(83,6)	1	
<b>Local de recrutamento</b>				
HJP	118	99(83,9)	1	
UCE	38	34(89,5)	1,63(0,51-5,13)	0,4
<b>Tipo de entrada no serviço</b>				
Caso novo	127	113(89,0)	3,79(1,38-10,39)	<0,01
Recidiva/Reingresso após abandono	25	17(68,0)	1	
<b>Forma clínica</b>				
Pulmonar(2)	148	127(85,8)	2,01(0,38-10,66)	0,4
Extrapulmonar/Pulmonar e extrapulmonar(1)	8	6(75,0)	1	
<b>Tipo de diagnóstico presuntivo</b>				
Baciloscopia positiva	136	114(83,8)	1	
Baciloscopia negativa	20	19(95,0)	3,66(0,46-28,77)	0,21
<b>Esquema de tratamento utilizado</b>				
Esquema I - básico (RHZ)	125	112(89,6)	1	
Recidiva/Reingresso - Esq. I - básico (RHZ)	17	12(70,6)	0,27(0,08-0,91)	0,03
Falência (5)/Esquema IR (SZEET) (1)	6	2(33,3)	0,05(0,01-0,34)	<0,01
<b>Dias de tratamento até a coleta da amostra</b>				
Mais de um mês de tratamento (35– 343)	28	19 (67,9)	1	
Até um mês de tratamento (1 – 34)	23	20 (87,0)	3,15(0,74-13,45)	0,12
Nenhum dia	98	89 (90,8)	4,68(1,64-13,36)	<0,01

Continua



Tabela 3 - Análise univariada da caracterização bioquímica, Juiz de Fora, Minas Gerais, março 2008 a fevereiro de 2010 (continuação)

Variáveis	Caracterização bioquímica			p-valor
	Total	Pos (%)	OR(IC95%)	
<b>Meio de crescimento da amostra analisada</b>				
Löwenstein-Jensen	84	69(82,1)	1	0,23
Stonebrink	72	64(82,9)	0,57(0,22-1,44)	
<b>Institucionalização</b>				
Sim (presídio, asilo, hospital psiquiátrico, albergues)	16	15(93,8)	1	0,3
Não	102	85(83,3)	0,33(0,04-2,69)	
<b>DOTS</b>				
Sim	89	74(83,1)	1	0,23
Não	44	40(90,9)	2,02(0,63-6,51)	
<b>Diagnóstico sorológico para HIV</b>				
Positivo	24	20(83,3)	1	0,31
Negativo	66	60(90,9)	2,00(0,51-7,81)	
<b>Vacina BCG</b>				
(1) Ausência de marca	29	23(79,3)	1	0,44
(3) Marca evidente	63	54(85,7)	1,56(0,49-4,90)	
<b>Encerramento</b>				
Cura	68	62(91,2)	1	0,07
Abandono/óbito/falência	26	20(76,9)	0,32(0,09-1,11)	
Transferência/em tratamento	62	51(82,3)	0,44(0,15-1,29)	

Tabela 4 - Análise univariada estratificada da caracterização bioquímica, Juiz de Fora, Minas Gerais, março 2008 a fevereiro de 2010 (evento: insucesso na caracterização)

Variáveis			OR (IC95%)	p-valor
	Total	Neg (%)		
A) Esquema de tratamento estratificada por dias de tratamento				
Sem tratamento	97	9(9,3)	1	
Esquema I ( até 10 dias de tratamento)	15	1(6,7)	0,69(0,08-5,94)	0,74
Esquema I ( de 11 a 180 dias de tratamento)	13	3(23,1)	2,93(0,68-12,64)	0,14
Recidiva/Reingresso - Esquema I (11 a 180 dias de tratamento)	11	3(27,3)	3,66(0,82-16,32)	0,08
Recidiva/Reingresso - Esquema I ( de 181 a 343 dias de tratamento)	6	2(33,3)	4,88(0,78-30,49)	0,08
Falência/Esquema IR (de 30 a 222 dias de tratamento)	6	4(66,7)	19,55(3,13-121,87)	<0,01
B) Esquema de tratamento por dias de tratamento simplificado				
Sem trat./Esquema I inicial (< 10 dias tratamento)	112	10(8,9)	1	
Esquema I em andamento (11 a 180 dias de tratamento)	13	3(23,1)	3,06(0,72-1,29)	0,12
Recidiva/Reingresso - Esquema I	17	5(29,4)	4,25(1,24-14,52)	0,02
Falência/Esquema IR	6	4(66,7)	20,40(3,31-125,45)	<0,01

Tabela 5 - Análise univariada da caracterização Molecular, Juiz de Fora, Minas Gerais , março 2008 a fevereiro de 2010

Variáveis	Caracterização molecular			p-valor
	Total	Pos (%)	OR(IC95%)	
<b>Sexo</b>				
Masculino	132	114(86,4)	1	
Feminino	42	35(83,3)	0,78(0,30-2,04)	0,62
<b>Idade</b>				
≤ 40anos	88	76(86,4)	1,12(0,48-2,63)	0,78
> 40anos	86	73(84,9)	1	
<b>Renda familiar mensal</b>				
≤ 1,9 salários mínimos(2)	55	50(90,9)	2,68(0,86-8,34)	0,08
> 2,0 salários mínimos(1)	52	41(78,8)	1	
<b>Município de residência</b>				
Juiz de Fora	149	128(85,9)	1,43(0,43-4,68)	0,55
Outros municípios	21	17(81,0)	1	
<b>Tipo de moradia</b>				
Barraco/quarto/presídio/rua/alberque/hospital psiquiátrico	22	18(81,8)	1,38(0,40-4,68)	0,6
Casa/apartamento	101	87(86,1)	1	
<b>Possui trabalho atual</b>				
Não trabalha/nunca trabalhou	51	45(88,2)	0,65(0,22-1,90)	0,43
Sim	65	54(83,1)	1	
<b>Local de recrutamento</b>				
HJP	136	114(83,8)	1	
UCE	38	35(92,1)	2,25(0,63-7,97)	0,2
<b>Tipo de entrada no serviço</b>				
Caso novo	142	121(85,2)	1	
Recidiva/Reingresso após abandono	28	24(85,7)	1,04(0,32-3,30)	0,94
<b>Forma clínica</b>				
Pulmonar	165	142(86,1)	1,76(0,34-9,02)	0,49
Extrapulmonar/Pulmonar e extrapulmonar	9	7(77,8)	1	
<b>Tipo de diagnóstico presuntivo</b>				
Baciloscopia positiva	153	133(86,9)	2,07(0,68-6,29)	0,19
Baciloscopia negativa	21	16(76,2)	1	

Continua

Tabela 5 - Análise univariada da caracterização Molecular, Juiz de Fora, Minas Gerais , março 2008 a fevereiro de 2010 (continuação)

Variáveis	Caracterização molecular			p-valor
	Total	Pos (%)	OR(IC95%)	
Esquema de tratamento utilizado				
Esquema I - básico (RHZ)	140	119(85,0)	1	
Recidiva/Reingresso - Esquema I - básico (RHZ)	20	18(90,0)	1,58(0,34-7,34)	0,55
Falência (5)/Esquema IR (SZEET)	6	5(83,3)	0,88(0,09-7,93)	0,91
Esquema Simplificado				
Sem tratamento/Esquema I (até 10 dias de tratamento)	126	108(85,7)	1	
Esquema I (11 a 180 dias de tratamento)	14	11(78,6)	0,61(0,15-2,40)	0,48
Recidiva/Reingresso - Esquema I	20	18(90)	1,50(0,32-7,01)	0,6
Falência/Esquema IR	6	5(83,3)	0,83(0,09-7,55)	0,87
Meio de crescimento da amostra analisada				
Löwenstein-Jensen	92	84(91,3)	2,74(1,11-6,75)	0,02
Stonebrink	82	65(79,3)	1	
Contaminação de cultura				
Sim	18	13(72,2)	1	
Não	156	136(87,2)	2,61(0,84-8,12)	0,09
Tempo e Temperatura de inativação				
(40min/84,1°C)	45	33(73,3)	1	
(40min/84,1°C)	45	35(77,8)	1,27(0,48-3,33)	0,62
(60min/84,5°C)	31	30(96,8)	10,90(1,33-88,99)	0,02
(70min/84,0°C)	50	48(96,0)	8,72(1,83-41,58)	<0,01
Institucionalização				
Sim (presídio, asilo, hospital psiquiátrico, albergues)	19	17(89,5)	1	
Não	115	95(82,6)	0,55(0,11-2,60)	0,45
DOTS				
Sim	104	89(85,6)	1	
Não	46	41(89,1)	1,38(0,47-4,05)	0,55

Continua

Tabela 5 - Análise univariada da caracterização molecular, Juiz de Fora, Minas Gerais, março 2008 a fevereiro de 2010 (continuação)

Variáveis	Caracterização molecular			p-valor
	Total	Pos (%)	OR(IC95%)	
<b>Diagnóstico sorológico para HIV</b>				
Positivo	25	22(88,0)	1	0,68
Negativo	72	61(84,7)	0,75(0,19-2,96)	
<b>Vacina BCG</b>				
Ausência de marca	32	29(90,6)	1	0,31
Marca evidente	70	58(82,9)	0,50(0,13-1,91)	
<b>Encerramento</b>				
Cura	79	65(82,3)	1	0,46
Abandono/óbito/falência	26	23(88,5)	1,65(0,43-6,27)	
Transferência/em tratamento	69	61(88,4)	1,64(0,64-4,18)	

Tabela 6 – Modelo de regressão logística multivariada para a caracterização molecular conclusiva, Juiz de Fora, 2008-2010.

Variável	Resultados conclusivos na caracterização molecular	
	OR (IC 95%)	valor de p
<b>Contaminação de cultura</b>		
Sim	1	<0,05
Não	5,42 (1,35-21,79)	
<b>Tempo/temperatura de inativação</b>		
1 (40 min/84,1°C)	1.0	0,6
2 (40 min/84,1°C)	1,28 (0,47-3,46)	
3 (70 min/84,0°C)	12,53 (2,35-66,72)	
4 (60 min/84,5°C)	14,51 (1,65-127,70)	

Tabela 7 – Concordância entre os testes bioquímicos e moleculares de caracterização

Análise bioquímica	Análise molecular		TOTAL
	Inconclusiva	Conclusiva	
Inonclusiva	2	21	23
Conclusiva	19	115	134
Não realizada (contaminou)	5	13	18
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>149</b>	<b>175</b>

Tabela 8 - Teste de sensibilidade de caracterização conclusiva, nas amostras que passaram por ambos os métodos diagnósticos, caracterização molecular como padrão ouro

Análise bioquímica	Análise molecular	
	Conclusiva	Inconclusiva
Conclusiva	115	19
Inconclusiva	22	2

Sensibilidade = 84,81% (IC95% = 80,56 - 89,05)

Tabela 9 - Teste de sensibilidade de caracterização conclusiva, nas amostras que passaram por ambos os métodos diagnósticos, caracterização bioquímica como padrão ouro

Análise molecular	Análise bioquímica	
	Conclusiva	Inconclusiva
Conclusiva	115	21
Inconclusiva	19	2

Sensibilidade = 86,66% (IC95% = 82,32 - 90,79)

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

**O artigo original 1** mostra uma maior prevalência de tuberculose em pacientes do sexo masculino 75,4%, 14,3% HIV positivos, 32% dos casos são em pacientes com renda familiar menor que 2 salários mínimos e o tipo de moradia de 12,6% é barraco/quarto/presídio/rua/albergue ou hospital psiquiátrico, isso reforça a afirmativa de que a situação sociodemográfica e econômica desfavorável aumentam consideravelmente as chances de um indivíduo adquirir a tuberculose.

O número de óbitos por tuberculose está em 9,7% não refletindo a média nacional isto provavelmente se deve ao fato do estudo ter sido feito com pacientes hospitalizados que normalmente tem uma taxa de mortalidade mais elevada do que pacientes ambulatoriais. Sessenta por cento dos pacientes tiveram tratamento supervisionado. Deve-se chamar a atenção, ainda, para o fato da maior parcela de pacientes ter iniciado o tratamento em um Hospital, o que pode incluir pacientes que tiveram o tratamento supervisionado por tempo inferior ao preconizado pela estratégia DOTS. Por outro lado, observa-se um alto índice de abandono (24%).

O alto índice de abandono e o baixo percentual de cura, observados, talvez esteja ligado ao fato da maioria dos casos terem sido diagnosticados em pacientes hospitalizados que após a alta hospitalar não dão continuidade ao tratamento por uma série de motivos entre eles, a droga, o alcoolismo e à falta de uma estrutura familiar.

Observa-se, também, que apenas 56% dos casos de tuberculose tiveram diagnóstico sorológico para HIV, talvez isso se deva à falta de conscientização dos profissionais da saúde sobre a importância da co-infecção TB/HIV.

Em relação ao diagnóstico presuntivo, a importância da realização de cultivo fica evidente neste estudo uma vez que dos pacientes com tuberculose extrapulmonar detectados, a metade somente foi identificada por meio de cultivo. Sugere-se expandir a cultura de micobactérias utilizando-se meios convencionais em paralelo com algum que favoreça o crescimento de *M. bovis*, como SB ou LJ contendo piruvato de sódio, para laboratórios macrorregionais, além dos centros nacionais e estaduais de referência em TB.

**O artigo original 2** mostrou associação entre o esquema de tratamento antibiótico utilizado/tipo de entrada no serviço e as taxas conclusivas de caracterização bioquímica. Aparentemente está havendo uma interferência do antibiótico usado no tratamento ou da situação de entrada no serviço (reingresso após abandono/recidiva, falência) sobre o metabolismo da micobactéria isolada, que aparentemente pode interferir na caracterização bioquímica. Esse fato deve ser avaliado com mais cuidado pelas autoridades de saúde e setores de diagnóstico bioquímico e fenotípico de micobactérias. Sugerem-se estudos futuros mais controlados e com uma maior amostragem para confirmar de forma mais acurada a interferência do esquema antibiótico utilizado, do tipo de entrada no serviço (se caso novo ou recidiva) sobre a caracterização bioquímica de micobactérias.

Por outro lado, este trabalho evidenciou associação entre a contaminação de micobactérias após o isolamento e do tempo de inativação do DNA com as taxas de amplificação do material genético de micobactérias por PCR. Um maior tempo de inativação parece ter levado a maiores taxas de amplificação de DNA. A explicação parece estar em possibilitar uma maior lise das membranas celulares e promover uma maior exposição do material genético a ser extraído e amplificado. Por isso, sugere-se estudos experimentais para definir qual a melhor combinação do binômio tempo/temperatura de forma a favorecer a caracterização molecular de micobactérias por amplificação de genes de cópia única como *pncA*, *oxyR*, entres outros.

Na comparação dos métodos bioquímico e molecular, o estudo mostra que dos 174 conhecidamente positivos para micobactérias que tiveram contaminação. Nestes casos, a caracterização bioquímica não foi possível, provavelmente, porque a contaminação das culturas causada por fungos ou bactérias inviabiliza a realização das provas bioquímicas de identificação.

Em relação à prevalência de espécies de micobactérias encontradas, a caracterização conjunta mostrou que a grande maioria dos casos foram causados pelo *M. tuberculosis*, no entanto, foi evidenciada a participação de *M. bovis* (0,6%) com perfil bioquímico (não confirmado por biologia molecular) em co-infecção com *M. tuberculosis*, e de *M. avium-intracellulare*, isoladamente (1,2%) ou em co-infecção com *M. tuberculosis* (1,2%). O fato da amostra com perfil bioquímico crescer apenas em meio Stonebrink (contém piruvato), demonstra a necessidade de inclusão na rotina, além do meio LJ, um meio de cultura que contenha piruvato (SB) como fonte de carbono em substituição ao glicerol.



As evidências de envolvimento de micobactérias não tuberculosas encontradas principalmente em pacientes em tratamento para AIDS, sendo confirmada em um deles a forma disseminada de micobacteriose, chama a atenção dos serviços envolvidos com o atendimento de pacientes infectados por HIV/AIDS para a importância de não somente solicitar o cultivo, mas também a caracterização micobacteriana em algumas situações em que micobactérias não tuberculosas sejam suspeitas. Isto facilitaria a escolha da terapia adequada direcionada a micobacterioses para esse grupo de pacientes em que essas micobactérias ainda apresentam prognóstico desfavorável, apesar do avanço dos anti-retrovirais.

## REFERÊNCIAS

1. 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. 5ª ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.
2. Smith I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin microbial 2003; 16:463-496.
3. Schuster M. Mycobacterial disease: a historical and epidemiologic perspective. Clin Dermatol 1995; 13(3):191.
4. Santos LC. Caracterização molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia-GO, pela técnica de RFLPIS6110 [dissertação]. Universidade Federal de Goiás Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Goiânia-GO, 2008.
5. Euzéby JP. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature – Societé de Bactériologie Systématique et Vétérinaire – France. Disponível em (URL: <http://www.bacterio.cict.fr>). Acesso em 20 dez 2011.
6. Brasil. Ministério da Saúde. II Consenso Brasileiro de Tuberculose. Jornal Brasileiro de Pneumologia. Brasília, 2004; 30(supl 1):54-6.
7. Boffo MMS, Mattos IG, Ribeiro, MO and Neto ICO. Tuberculosis associated to AIDS: demographic, clinical and laboratory characteristics of patients cared for at reference center in the south of Brazil. Jornal Brasileiro de Pneumologia 2004; 30 (4):140-46.
8. Baptista IM, Oelemann MC, Opromolla DV et al. Drug resistance and genotypes of strains of Mycobacterium tuberculosis isolated from human immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(8):1147-52.
9. Antonucci G, Girardi E, Raviglione MC, Ippolito G. Risk Factors for tuberculosis in HIV-infected persons. A prospective cohort study. The Gruppo Italiano di Studio Tubercolosi e AIDS (GISTA). JAMA. 1995; 274(2):143-8.
10. WHO, World Health Organization. Global Tuberculosis Control. TB prevalence surveys: a handbook. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/HTM/TB/2011.17).
11. WHO, World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva, 2008.
12. Oelemann MC, Fontes AN, Pereira MA et al. Typing of Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Community health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102(4):455-62.

13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Jr. Diagnóstico Microbiológico-Texto e atlas colorido. 5ª Ed. Rio de Janeiro 903-950; 2001. Translation of: AE Cury.
14. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. Rev. Saúde Pública, São Paulo, 1999; 33(3):281-286.
15. Daniel Brodie MD, Neil W, Schluger MD. The diagnosis of tuberculosis. Clin Chest Med. New York 2005; 26:247-271.
16. Brasil Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 3ª Ed. Edição comemorativa, Rio de Janeiro, 2005.
17. Vieira FD. Análise de uma metodologia para caracterização de proficiência de leitores de baciloscopia para a tuberculose [dissertação]. Manaus, AM: UFAM, 2005.
18. David H, Brum L, Prieto E. Manual de Micobacteriologia em Saúde Pública - Princípios e Métodos. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 1994.
19. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985; 30.
20. Supply P, Mazars E, Lesjean S *et al.* Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol 2000; 36(3):762-71.
21. EMBRAPA, Pecuária Sudeste. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de Reação em cadeia da polimerase. São Carlos, 2007.
22. Oliveira EMD, Moraes ZM, Tabata R *et al.* Avaliação da virulência em hamsters (*Mesocricetus auratus*) de estirpes de *Mycobacterium avium* presentes na população de suínos do sul do Brasil. Braz J Vet Res Anim Sci 2002; 39:202-207.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed. Brasília, 2009.
24. Gomes M. Gênero *Mycobacterium spp.* Tuberculoses e Paratuberculoses. Microbiologia Clínica Veterinária. Área de bacteriologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

## ANEXO

## Parecer do comitê de Ética da FHEMIG nº 055/2011



## PARECER Nº. 055/2011

Data: 03/8/2011  
 Registro CEP/FHEMIG: 055/2011 (este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).

FR- 443231  
 CAAE – 0036.0.287.000-11

Hospital Regional Dr. João Penido – HRJP/FHEMIG.  
 Pesquisador responsável: **Ronaldo Rodrigues da Costa**.

## DECISÃO:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FHEMIG) aprovou em 07 de julho de 2011, o projeto de pesquisa intitulada: "Aprofundamento do diagnóstico de tuberculose no Brasil, com a inclusão do meio Stonebrink em paralelo ao Löwenstein - Jensen e de métodos bioquímicos e moleculares".

Segundo o item VII.13.4 da Resolução 196/96, os pesquisadores ficam **OBRIGADOS** a enviar relatórios anualmente.  
 Assim o relatório parcial deverá ser entregue em 07/07/2012 e/ou o relatório final ao término da pesquisa.  
 O relatório poderá seguir o modelo de acompanhamento disponível na Intranet/FHEMIG.

- Formulário CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – deverá ser assinado, pelo pesquisador responsável, nos espaços apropriados, e em seguida o NEP deverá encaminhar a este CEP/FHEMIG-02 (duas) vias, enquanto a outra deverá ser entregue ao pesquisador responsável.

Walderson Assis Romualdo  
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

SIPRO: DO 3445120-33 - 6

Alameda Vereador Álvaro Celso, 100 - Santa Efigênia - Belo Horizonte/MG  
 CEP: 30150-200 - Fone: (0xx31) 3239-8000 - Fax: (0xx31) 3239-9679  
 Site: <http://www.fhemig.mg.gov.br> E-mail: [fhemig@fhemig.mg.gov.br](mailto:fhemig@fhemig.mg.gov.br)