

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE
Mycobacterium tuberculosis FRENTE A AGENTES
TUBERCULOSTÁTICOS NO ÂMBITO DO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanessa Albertina Agertt

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE
Mycobacterium tuberculosis FRENTE A AGENTES
TUBERCULOSTÁTICOS NO ÂMBITO DO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA.**

por

Vanessa Albertina Agertt

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas: Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof. Dra. Marli Matiko Anraku de Campos

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *Mycobacterium tuberculosis* FRENTE A AGENTES TUBERCULOSTÁTICOS NO ÂMBITO DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA.

elaborada por
Vanessa Albertina Agertt

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marli Matiko Anraku de Campos, Dra.
(Presidente/Orientador)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Roberto Christ Vianna Santos, PhD. (UNIFRA)

Santa Maria, 31 de julho de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que nas suas mais diferentes formas de manifestação, está sempre presente guiando meus passos.

Aos meus pais Ironi e José, meus maiores exemplos, pelo amor, compreensão, ensinamentos, apoio em todos os momentos; e ao meus irmãos, Fábio e Valéria, pelo carinho.

Ao Erico, pelo amor, carinho, amizade, incentivo, parceria, compreensão em todos os momentos.

À minha orientadora Prof.(a) Dr. (a) Marli M.A. de Campos, pela orientação, amizade, paciência, confiança, dedicação e apoio dado à realização deste trabalho. Minha admiração e gratidão.

Aos professores Dr. Sydney H. Alvez , PhD. Roberto C.V. Santos e Dr(a) Sandra T. Beck, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Ao Prof. Rafael, a Prof.(a) Margarete e demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Aos amigos de Laboratório Pauline, Tanise, Jaciane, Caren, Vanessa F. e Bianca, muito importantes em todas as etapas do meu trabalho, pelo convívio amigo.

Às minhas vizinhas de laboratório Bruna e Paula pelo apoio e horas de descontração.

À Daniele, sempre disposta a ajudar e ao Prof. Mario por disponibilizar tempo e infraestrutura.

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e não estão nominalmente citados.

Ao CNPq e a CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela possibilidade de realização deste curso.

“Sempre antes de realizar um sonho,
a alma do mundo resolve testar tudo aquilo que foi aprendido durante a caminhada.

Ela faz isso não porque seja má,
mas porque possamos, junto com nosso sonho,
conquistar também as lições que aprendemos seguindo em direção a ele”.

(Paulo Coelho)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *Mycobacterium tuberculosis* FRENTE A AGENTES TUBERCULOSTÁTICOS NO ÂMBITO DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA.

AUTORA: VANESSA ALBERTINA AGERTT

ORIENTADORA: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de julho de 2012.

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e outras denominadas de micobactérias não tuberculosas (MNT). Os bacilos do CMTB causam a tuberculose (TB), uma doença infecciosa bacteriana, a qual comumente afeta os pulmões. Já as MNT causam outras micobacterioses. O diagnóstico correto das doenças causadas pelas micobactérias é essencial para a definição do tratamento. O esquema de tratamento para a tuberculose no Brasil é preconizado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose/Ministério da Saúde (PNCT/MS) e foi recentemente modificado. As principais mudanças propostas pelo Comitê Técnico Assessor do PNCT/MS foram: introduzir um quarto fármaco, o etambutol, na fase de ataque e adotar a associação dos fármacos em forma de comprimidos, com doses fixas combinadas (DFC) 4 em 1, para a fase de tratamento intensivo, e, 2 em 1, para fase de manutenção. Devido à grande incidência da tuberculose no Brasil e no mundo, à emergência de cepas resistentes e à implantação de novas terapias pelo Ministério da Saúde, este trabalho objetivou avaliar a suscetibilidade aos tuberculostáticos associados ou individualmente dos isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* do Hospital Universitário de Santa Maria. A suscetibilidade aos antimicrobianos isolados ou associados (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) foi avaliada através do método de microdiluição em caldo (MMC) e comparados ao método das proporções (MP), método padrão ouro para suscetibilidade de micobactérias. O MMC mostrou-se ser um método rápido, de fácil realização e boa correlação com o MP. Foram encontrados vários isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a um, dois ou três fármacos quando testados frente aos quatro fármacos isoladamente. Porém, quando estes foram, testados contra os quatro fármacos da DFC associados nenhuma cepa foi considerada resistente. Este fato vem de encontro ao conceito da DFC a qual pretende unir os quatro medicamentos anti-TB para combater a resistência dos bacilos.

Palavras-chave: Dose fixa combinada, Suscetibilidade, *Mycobacterium tuberculosis*, micobactérias não-tuberculosas, método de microdiluição em caldo, método das proporções.

ABSTRACT

Master Dissertation
Professional Graduation Program in Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria

EVALUATION OF THE PROFILE OF SUSCEPTIBILITY *Mycobacterium tuberculosis* FRONT OF AGENTS TUBERCULOSTATIC UNDER THE UNIVERSITY HOSPITAL OF SANTA MARIA.

AUTHOR: VANESSA ALBERTINA AGERTT
ADVISER: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS
Defense Place and Date: Santa Maria, July 31st, 2012.

The *Mycobacterium* genus includes *M. tuberculosis* complex (CMTB) species and others called nontuberculous mycobacteria (MNT). The CMTB bacilli cause tuberculosis (TB), a bacterial infectious disease, which commonly affects the lungs. Since the MNT cause other mycobacterial infections. The correct diagnosis of diseases caused by mycobacteria is essential for determining treatment. The tuberculosis treatment regimen in Brazil is recommended by the National Tuberculosis Control/Ministry of Health (PNCT/MS) and was recently modified. The main changes proposed by the Technical Advisory Committee of PNCT/MS were: to introduce a fourth drug, ethambutol, during the attack and take the combination of drugs in tablet form, with fixed-dose combinations (FDC) 4 in 1, for intensive treatment phase, and 2 in 1 for the maintenance phase. Due to the high incidence of tuberculosis in Brazil and worldwide, the emergence of resistant strains and the deployment of new therapies by the Ministry of Health, this study aimed to evaluate the susceptibility to antituberculosis or individually associated clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the University Hospital Mary. The antimicrobial susceptibility alone or associated (rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol) was evaluated using the microdilution method (MMC) and compared to the proportion method (MP), gold standard method for susceptibility to mycobacteria. The MMC has proven to be a rapid, easily performed and well correlated with the MP. We have found various clinical isolates of *M. tuberculosis* resistant to one, two or three drug when tested against four drugs alone. However, when they were tested against four drugs associated with the FDC no strain was considered resistant. This fact is against the concept of FDC which aims to unite the four anti-TB drugs to combat the resistance of the bacilli.

Key words: Fixed dose combination, Susceptibility, *Mycobacterium tuberculosis*, nontuberculous micobactérias, microdiluation broth metod, proportion metod.

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO I

Figura 1 – Porcentagens da classificação das micobactérias isoladas entre 2008 e 2010.	26
Figura 2 – Distribuição das micobactérias conforme sítios isolados.	26

MANUSCRITO II

Figura 1 – Porcentagem de cepas resistentes pelo método das proporções. Rifampicina (RMP), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB)	36
Figura 2 – Porcentagem de cepas resistentes pelo método de microdiluição em caldo. Isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB)	36
Figura 3 - Correlação entre as CIMs ($\mu\text{g/mL}$) encontradas no método de microdiluição em caldo e método das proporções classificados para a rifampicina	37
Figura 4 - Correlação entre as CIMs ($\mu\text{g/mL}$) encontradas no método de microdiluição em caldo e método das proporções classificados para a isoniazida.	37
Figura 5 - Correlação entre as CIMs ($\mu\text{g/mL}$) encontradas no método de microdiluição em caldo e método das proporções classificados para o etambutol.	38
Figura 6 - Correlação entre as CIMs ($\mu\text{g/mL}$) encontradas no método de microdiluição em caldo e método das proporções classificados para a pirazinamida.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - concentrações críticas empregadas nos testes de sensibilidade e a proporção crítica de mutantes resistentes.	11
Tabela 2 – Esquema básico para adultos e adolescentes.	17

MANUSCRITO II

Tabela 1 – Comparação dos dados obtidos quanto a suscetibilidade aos fármacos testados em 43 cepas de M. tuberculosis através do método das proporções e do método de microdiluição em caldo e resultados de sensibilidade e especificidade.	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS – American Thoracic Society
BAAR – bacilo álcool-ácido resistente
BCG – Bacillus Calmette-Guérin
CAAE – Câmara Técnica de Documentos Eletrônicos/Conarq
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CIM – concentração inibitória mínima
CMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
DACT/UFSM – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria
DFC – Dose Fixa Confirmada
DNA – ácido desoxiribonucleico
EMB – etambutol
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HUSM – Hospital Universitário de Santa Maria
INH – isoniazida
LAC-HUSM – Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria
LJ – Lowesten-Jensen
MAC – complexo *Mycobacterium avium*
MD7H9 – meio base de Middlebrook 7H9
MDR-TB – Tuberculose resistente a múltiplas drogas
MMC – método de microdiluição em caldo
MNT – Micobacterias não tuberculosas
MP – método das proporções
MTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PNB – Ácido para-aminobenzóico
PNCT/MS – Tuberculose extremamente resistente aos medicamentos
PZA – pirazinamida
RMP – rifampicina
RNA – ácido ribonucleico
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TB – Tuberculose
UFSM – Universidade Federal de Santa Maria
XDR-TB – Tuberculose extremamente resistente aos medicamentos

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO DA LITERATURA	4
1 Micobacterioses	4
2 Tuberculose	5
2.1 Tuberculose pulmonar	6
2.2 Agente etiológico	6
2.2.1 Características gerais	7
2.2.2 Estrutura e composição química	7
2.2.3 Genoma do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.3 Diagnóstico bacteriológico	8
2.3.2 Baciloscopia de bacilos álcool-ácido resistentes	8
2.3.2 Cultura	9
2.3.3 Métodos Moleculares com Amplificação PCR	10
2.3.4 Testes de suscetibilidade	11
2.3.4.1 Método das proporções	11
2.3.4.2 Métodos de microdiluição em caldo	12
2.3.4.3 Métodos moleculares	12
2.4 Patogenia	13
2.5 Tratamento	13
2.5.1 Rifampicina	14
2.5.2 Isoniazida	14
2.5.3 Pirazinamida	15
2.5.4 Etambutol	15
2.6 Resistência aos antimicrobianos	15
2.7 Mudanças no tratamento da tuberculose	16
2.7.1 Benefícios do novo tratamento	17
OBJETIVOS	19
1 Objetivo Geral	19
2 Objetivos Específicos	19
MANUSCRITOS	20
1 Manuscrito I	20
2 Manuscrito II	27
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE A – Tabela de resultados comparativos entre os métodos utilizados.	50
APÊNDICE B – Tabela de resultados da classificação epidemiológica.	52
ANEXO A – Comprovante de submissão do manuscrito II para publicação no periódico Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial.	55
ANEXO B – Carta de aprovação Comitê de Ética em pesquisa - UFSM	57

APRESENTAÇÃO

No item **REVISÃO DA LITERATURA**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item **MANUSCRITOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa bacteriana causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a qual muito comumente afeta os pulmões. O bacilo é transmitido de pessoa a pessoa via aerossóis provenientes da garganta e dos pulmões dos pacientes com a doença respiratória ativa. Em indivíduos saudáveis, a infecção por *M. tuberculosis* frequentemente não causa sintomas, uma vez que o sistema imune age isolando o microrganismo. Os sintomas da TB ativa nos pulmões são tosse, expectoração, às vezes com sangue, dores no peito, fraqueza, perda de peso, febre e sudorese noturna (TUBERCULOSIS, 2011).

A incidência de TB vem decrescendo desde 2006 no Brasil e no mundo. Caso essa tendência se sustente, a meta da Organização Mundial de Saúde (OMS) para 2015 de reduzir a prevalência e mortalidade em 50%, em comparação com os níveis de 1990 será alcançada. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). A tuberculose continua a merecer especial atenção dos profissionais de saúde e da sociedade como um todo. Ainda obedece a todos os critérios de priorização de um agravo em saúde pública, ou seja, grande magnitude, transcendência e vulnerabilidade (BRASIL, 2010). A OMS continua recomendando que os países não poupem esforços para combater a tuberculose. É necessário aperfeiçoar o diagnóstico e melhorar a aderência dos pacientes ao tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Atualmente há um acréscimo na incidência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplos fármacos; esta resistência é causada, entre outros fatores, pela não aderência de pacientes ao tratamento da tuberculose, já que este é longo e com muitos efeitos colaterais (MSHANA et al., 1998). Além disso, o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) vem contribuindo para o aumento do número de casos e da gravidade da doença causada pelo bacilo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O impacto clínico da resistência é imenso, sendo caracterizado pelo aumento nos custos do tratamento, bem como maior morbidade e mortalidade. Nos dias atuais o abuso dos antimicrobianos convencionais para o tratamento de infecções microbianas tem aumentado os índices de resistência (JUNEYOUNG et al., 2009).

A TB geralmente pode ser tratada com um curso padrão de quatro fármacos, também chamado de primeira linha de medicamentos anti-TB. Porém algumas cepas podem desenvolver resistência a estes fármacos e os pacientes portadores destes microrganismos irão desenvolver tuberculose resistente a múltiplos fármacos (MDR-TB). Uma MDR-TB requer

muito tempo para ser tratada, com medicamentos de segunda linha, que são mais caros e apresentam mais efeitos colaterais. A XDR-TB, abreviação para tuberculose extremamente resistente aos medicamentos, pode desenvolver-se quando os medicamentos de segunda linha também são mal utilizados ou mal administrados e, portanto, tornam-se ineficazes. Como XDR-TB são resistentes a fármacos de primeira e de segunda linha, as opções de tratamento ficam muito limitadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O sistema de tratamento para TB recomendado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose/Ministério da Saúde (PNCT/MS) desde 1979, com a introdução da rifampicina e unificações de ações, foi modificado. As principais mudanças propostas pelo Comitê Técnico Assessor do PNCT/MS são: introduzir um quarto fármaco, o etambutol, na fase de ataque e adotar a associação dos fármacos em forma de comprimidos, com doses fixas combinadas 4 em 1 (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol), para a fase de tratamento intensivo, e 2 em 1 (rifampicina e isoniazida), para fase de manutenção. (GRUPO DE TRABALHO DAS DIRETRIZES PARA TUBERCULOSE DA SBPT, 2009)

Devido à grande incidência da tuberculose no Brasil e no mundo, a emergência de cepas resistentes e a implantação de novas terapias pelo Ministério da Saúde, o monitoramento e a avaliação do perfil de suscetibilidade a fármacos antituberculostáticos em isolados clínicos são medidas necessárias para o controle da tuberculose. Além disso, o melhor entendimento do comportamento bacteriano em relação às terapias medicamentosas atualmente aplicadas em pacientes portadores de TB ativa pode auxiliar na efetividade terapêutica e sucesso do tratamento.

REVISÃO DA LITERATURA

A denominação do gênero *Mycobacterium* originou-se do latim “*fungus bacterium*”, pelo fato do *M. tuberculosis* apresentar algumas características semelhantes aos fungos quando cultivado em meio líquido. Estes bacilos tinham características morfológicas de bacilos e tintoriais de álcool-ácido resistência (COLLINS et al., 1997). Posteriormente, foram visualizados e isolados, tanto do homem como do meio ambiente, vários outros bacilos com as mesmas características tintoriais do *M. tuberculosis*, entretanto, com diversificações no tempo de crescimento *in vitro*, produção de pigmentos e patogenicidade para aos seres humanos. A partir da década de 90, um número crescente de novas espécies tem sido descritas e até o momento 125 espécies e 11 subespécies são reconhecidas oficialmente (EUZÉBY, 2007).

Com exceção do *M. leprae* que não cresce *in vitro*, essas espécies são divididas em dois grupos, as espécies pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e as Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT) (GRIFFITH et al., 2007). O CMTB é composto por *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. africanum*, *M. microti*; *M. caprae* e *M. pinnipedii* sendo os quatro últimos encontrados em baixa frequência em nosso país (BRASIL, 2005; BRASIL,2008). Além do CMTB, tem-se o Complexo *M. avium* (MAC) que agrupa as espécies *M. avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum* e Complexo *M. terrae* as espécies *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale* (BRASIL,2008). Recentemente, algumas espécies de crescimento rápido foram reunidas em três grupos: grupo *M. fortuitum* composto pelas espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense* *M. bonickei*; grupo *M. chelonae* pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum* e grupo *M. smegmatis*, pelas espécies *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. godii* (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002).

1 Micobacterioses

As MNT têm sido documentadas desde os anos 1950 como organismos capazes de causar doença em humanos recebendo maior reconhecimento clínico com a queda na incidência de tuberculose (MOORE et al., 2010). Quando responsáveis por processos patológicos em humanos, as MNT podem acometer qualquer tecido dos sistemas ou

disseminar-se por todo o organismo, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A doença que ocasionam é denominada de micobacteriose, independentemente da espécie responsável pela patologia. (BRASIL, 2008).

Infecções causadas pelas MNT geralmente não são notificadas aos departamentos de saúde pública, assim, dados sobre a incidência e distribuição destes são escassos (SATYANARAYANA et al., 2011). No entanto, alguns autores sugerem que infecções causadas por MNT estejam aumentando em algumas áreas (BILLINGER et al., 2009; LAI et al., 2010; FERREIRA et al., 2012; SENNA et al., 2012), fazendo com que a demografia e a distribuição destas MNT sejam estudadas. Estima-se que a prevalência média anual das doenças por MNT consistam em 5,5 casos por 100 mil habitantes, com um aumento anual da prevalência de 2,6% (GRIFFITH & TIMOTHY, 2012). O aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, devido ao câncer, transplante, e ao HIV, ou outras condições, têm sido relacionado com o aumento desta prevalência (SONG et al., 2009).

Os protocolos para tratamento da tuberculose e para tratamento das infecções causadas pelas MNT diferem; assim o diagnóstico diferencial da tuberculose e MNT são essenciais para estabelecer o tratamento (SONG et al., 2009; BRASIL, 2005).

2 Tuberculose

Definida como moléstia infecto-contagiosa dos pulmões, a tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. A doença tem algumas características marcantes, como um longo período de latência entre a infecção inicial e a apresentação clínica, preferência pelo acometimento pulmonar (embora outros órgãos possam ser envolvidos), e resposta granulomatosa associada à intensa inflamação e lesão tissular (KUMAR, 1994).

A OMS estima que, em 2010, houve uma incidência de 8,8 milhões de novos casos de tuberculose e/ou recaídas da doença no mundo. Neste período em torno de 1,4 milhões de pessoas morreram de tuberculose, incluindo 0,35 milhões de pacientes HIV positivos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

A incidência de TB vem decrescendo desde 2006. O número de casos novos notificados a cada 100 mil habitantes tem diminuído 1,3% a cada ano, desde 2002. O Brasil tem acompanhado índices semelhantes. Caso essa tendência se sustente, a meta da OMS para 2015 de reduzir a prevalência e mortalidade em 50%, em comparação com os níveis de 1990 será alcançada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Embora a prevalência da

tuberculose esteja diminuindo, ainda há muito que melhorar principalmente no que se refere aos casos de resistência.

O quarto relatório global sobre a resistência a fármacos anti-TB fornece os dados mais recentes sobre a extensão do problema no mundo. A prevalência média de MDR-TB em novos casos de tuberculose foi de 1,6%, e em casos de tuberculose tratados previamente 11,7% (CHIANG et al., 2010). No Brasil a incidência da tuberculose foi de 43,0 (36,0-51,0) indivíduos por 100.000 habitantes por ano em 2010; destes 2,6 (1,6-4,3) indivíduos por 100.000 habitantes morreram da doença. A prevalência média MDR-TB em novos casos de tuberculose foi de 0,9%, enquanto que em casos de tuberculose tratados previamente essa prevalência passa para 5,4% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011)

2.1 Tuberculose pulmonar

Após o contágio, o microrganismo poderá ser destruído através de mecanismos de imunidade inata através de uma rápida resposta inflamatória, porém, caso isso não ocorra, o bacilo é capaz de ocasionar uma progressão da inflamação e broncopneumonia inespecífica (TARANTINO, 2002). Então neste momento, o bacilo começa a se dividir e aumentar em número o foco de inoculação podendo atingir em 15 dias 100 mil microrganismos, passando a ser chamado de foco de Ghon apresentando uma forma arredondada e de consistência amolecida com 1 a 2 mm de tamanho (BRASIL, 2002).

Nas lesões pulmonares iniciais 95% dos focos de Ghon evoluem para fibrose e/ou calcificação, no restante dos casos, seja pela carga infectante ou por deficiência da imunidade celular, há uma liquefação do caseo e o desenvolvimento da doença a qual é conceituada como tuberculose primária (BRASIL, 2002).

Se a lesão primária evoluir para a cura clínica e anos mais tarde for reativada, ou o organismo receber nova carga de bacilos, geralmente mais virulentos, a doença passa a ser chamada de tuberculose pós-primária ou do adulto. Como o indivíduo já apresenta, neste caso, memória imunológica ocorre uma reação inflamatória do tipo hipersensibilidade, caracterizada por cavitação e fibrose (KUMAR, 1994).

2.2 Agente etiológico

O bacilo da tuberculose foi descoberto por Robert Koch em 1882, sendo por isso designado bacilo de Koch. Três tipos de bacilos são patogênicos para o homem: o bacilo

humano, responsável praticamente por toda a tuberculose pulmonar, o bacilo bovino (*M. bovis*), o qual é pouco incidente desde a pasteurização compulsória do leite, e o *M. africanum* (FARIA et al., 2003). O bacilo humano é hoje denominado *Mycobacterium tuberculosis* o qual empresta o nome a um complexo que abriga outras bactérias como o *M. bovis*-BCG, usado na elaboração da Vacina BCG, e o *M. microti*, um patógeno animal (TARANTINO, 2002).

2.2.1 Características gerais

O *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo imóvel, ligeiramente curvo, não esporulado, não encapsulado, porém sua parede celular possui um conteúdo lipídico que é responsável pela formação do granuloma característico causado pelo gênero *Mycobacterium*. Por ser um microrganismo aeróbio, tem preferência em multiplicar-se no pulmão, podendo ficar em estado de dormência por longos períodos causando reativações. Possui um tempo de geração, em meios apropriados, de 14 a 20 horas; por isso é considerado de crescimento lento. Além dessas características, uma peculiaridade importante é o agrupamento dos bacilos formando ramos alongados e tortuosos conhecidos como cordas. A observação do fator corda na baciloscopia é considerada indicação de *M. tuberculosis* (BRASIL, 2002).

2.2.2 Estrutura e composição química

O *M. tuberculosis* possui uma parede bacteriana rígida, três camadas dispostas de fora para dentro: uma lipoprotéica, uma polisacarídica, e a mais interna a mucopeptídica: esta última é a mais rígida. Os componentes químicos mais importantes do conjunto destas membranas são o ácido murânico, o ácido micólico e alguns polissacarídeos contendo alanina, manose, galactose, ácido glutâmico, ácido diaminopimélico (TARANTINO, 2002). O estudo dos ácidos micólicos é importante sob vários aspectos, e sobre tudo, porque o micol é que determina a álcool-ácido resistência. Entre os micósides, há um glicolípido sulfatado que favorece a sobrevivência de bacilos nos macrófagos por impedir a fusão de fagossomas com lisossomas (VIADER- SALVADÓ et al., 2007).

É sensível ao calor e a radiação ultravioleta sendo degradado se exposto ao sol. Porém, é resistente a agentes químicos como solução de hidróxido de sódio, fosfato trisódico ou cloreto de cetilpiridinium ao contrário de outros microrganismos. Este fato é muito importante

na descontaminação de espécimes antes da realização de cultivo para diagnóstico (BRASIL, 2002).

2.2.3 Genoma do *Mycobacterium tuberculosis*

Em 1998 informou-se afinal que todo o genoma do *M. tuberculosis* tinha sido decifrado, trabalho que contou da associação de 21 centros de pesquisa, de Paris (Instituto Pasteur), Inglaterra (Hinston), Copenhague e Estados Unidos. Serviu de base para a decodificação do genoma a cepa H37Rv. Os primeiros resultados revelam que o *M. tuberculosis* contém 4.000 genes, dos quais 3.924 já estão decifrados 4.411.529 pares de base. Das proteínas, 40% têm suas funções definidas com precisão, 44% com algum conhecimento e 16% desconhecidas. Há muitos elementos repetitivos ricos em guanina e citosina. Trinta genes são reguladores da RNA polimerase, 140 genes são reguladores da transcriptase e os outros 250 fazem biossíntese de várias classes de lipídios e isso explica a complexidade da membrana envolvente da bactéria com ácido micólico, glicopeptídeos e lipocarboídratos (COLE et al., 1998).

2.3 Diagnóstico bacteriológico

O diagnóstico da tuberculose deve ser realizado avaliando-se a história clínica do paciente juntamente com exames utilizados na investigação da tuberculose. Estes exames podem ser: bacteriológicos, bioquímicos, citológicos, radiológicos, histopatológicos e imunológicos. Dentre os atualmente utilizados na rotina, o exame bacteriológico, é o que permite a confirmação do diagnóstico (BRASIL, 2002).

2.3.2 Baciloscopia de bacilos álcool-ácido resistentes

Segundo o Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 2005) a baciloscopia é o exame básico para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose, especialmente na forma pulmonar. É utilizada pra acompanhar a eficácia do tratamento através da redução bacilar e negatificação do escarro em exames mensais, enquanto o paciente tiver expectoração.

O método de baciloscopia de escarro usando corantes que evidenciam bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) não permite a identificação de espécies de micobactéria e não permita a diferenciação entre células viáveis e inviáveis. Porém, o procedimento oferece a

vantagem de fornecer, em horas, ao invés de dias ou semanas, informações úteis sobre bacilos álcool-ácido resistentes em alguns pacientes antes e durante a quimioterapia (HOBBY et al., 1973).

O número ideal de amostras de escarro para estabelecer o diagnóstico da tuberculose é de 3 esfregaços analisados (HOPEWELL et al., 2006). Segundo Hoby et al, a preparação de esfregaços por este método produziu um notável grau de reprodutibilidade quando vários esfregaços da mesma amostra foram examinados.

O diagnóstico da TB em países de renda média e baixa, onde mais de 90% dos casos de tuberculose ocorrem, é realizado principalmente por este método (PAI et al., 2006). O International Standards for Tuberculosis Care considera a análise microscópica de duas ou três amostras por paciente o preconizado para o diagnóstico de TB (FAIR et al., 2007). Embora esta microscopia seja barata, fácil de executar e altamente específica nas áreas onde há uma alta prevalência de TB, é relativamente insensível, quando necessário um número maior que 10^4 bacilos por mL de escarro para alcançar um resultado positivo (HOBBY et al., 1973).

A sensibilidade da microscopia é influenciada por inúmeros fatores, como a prevalência e gravidade da doença, a qualidade da coleta da amostra, o tipo de amostra, o método de processamento (direta ou concentrada, a centrifugação, liquefação), coloração e, finalmente, a qualidade do exame (PETERSON et al., 1999). Realizado por profissionais bem treinados, o teste detecta bacilos da tuberculose em 75% de todas as pessoas que têm tuberculose pulmonar ativa, mas a sensibilidade pode cair para 45-60%, dependendo do treinamento e da motivação do técnico de laboratório (ABER et al., 1980).

2.3.2 Cultura

Até o momento, o diagnóstico de certeza da tuberculose é realizado através de cultura do material da lesão com isolamento e identificação do bacilo (BRASIL, 2002). Os espécimes clínicos utilizados para o isolamento de micobactérias podem ser contaminados, isto é podem apresentar microbiota associada, no escarro, lavados, aspirados, urina, material de cavidade aberta. Estes espécimes devem ser tratados com a finalidade de eliminar os microrganismos contaminantes, que por se desenvolverem muito mais rapidamente que as micobactérias, impedem a multiplicação destas. Esse tratamento é feito com agentes químicos aos quais as micobactérias são conhecidamente mais resistentes, e, além disso, possibilita a digestão da matéria orgânica do material (BRASIL, 2005).

O meio de cultura mais utilizado para o isolamento de *M. tuberculosis* nos laboratórios de bacteriologia da tuberculose é o de Lowenstein-Jensen. É um meio complexo, rico e propicia o crescimento da maioria das micobactérias. O crescimento do *M. tuberculosis* em colônias rugosas amarelo-claras ocorre em torno de 28 dias de incubação a temperatura de 37°C. Este método torna-se positivo se o material contiver entre 10 e 100 bacilos (BRASIL, 2002).

Em 1958, Runyon propôs uma divisão das micobactérias mais frequentemente isoladas no laboratório, baseada em características simples de serem observadas: o tempo de crescimento e a pigmentação das colônias. Originalmente constava de quatro grupos e não incluía as espécies típicas como *M. tuberculosis* e as não cultiváveis como o *M. leprae*. Estes quatro grupos são: grupo I (Fotocromogênicas), grupo II (Escotocromogênicas), grupo III (Não-cromogênicas) e grupo IV (Crescimento rápido). Esta classificação ainda é de grande utilidade e, juntamente com as provas de crescimento na presença de agentes inibidores, permitem constituir grupamentos preliminares antes da escolha dos testes bioquímicos para a identificação em espécies, dentro de cada grupo (BRASIL, 2005).

Há outros métodos de cultura disponíveis comercialmente que proporcionam um diagnóstico mais rápido, como o sistema BACTEC 460 TB, MGIT, MB/Bact. O sistema BACTEC 460 TB ou BACTEC 960 é um método radiométrico que através de um aparelho semiautomatizado, detecta CO₂ radioativo liberado pela utilização do ácido palmítico, presente no meio de cultura (BRASIL, 2002).

2.3.3 Métodos Moleculares com Amplificação PCR

A reação de PCR – Reação de Polimerase em Cadeia, realizada em termociclador, permite a geração de bilhões de moléculas de DNA a partir de algumas cópias presentes na cultura ou amostra clínica. O material amplificado é detectado em gel de agarose após coloração ou através de hibridização e visualização por reação colorimétrica ou em autoradiograma. Determina-se a especificidade da amplificação através do desenho de iniciadores adequados, permitindo o reconhecimento do *M. tuberculosis* e de outras micobactérias. Uma das sequências mais utilizadas é a inserção IS6110, devido ao fato de estar presente no genoma do bacilo em múltiplas cópias, aumentando, desta maneira, a sensibilidade da técnica (BRASIL, 2002).

2.3.4 Testes de suscetibilidade

A suscetibilidade do *M. tuberculosis* aos antimicrobianos pode ser avaliada por várias metodologias, mas o método das proporções é o mais utilizado e está entre os aceitos pela Organização Mundial de Saúde.

2.3.4.1 Método das proporções

A suscetibilidade frente a agentes antimicrobianos testados separadamente é realizada através do método das proporções descrito por Canetti, et al (1963). Este método consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente a uma concentração de medicamentos que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não o das células resistentes (concentração crítica). Para cada medicamento foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente (proporção crítica).

Utilizam-se concentrações diferentes para cada antimicrobiano, que é incorporado ao meio antes da coagulação, bem como proporções de bacilos sensíveis e resistentes para realizar a avaliação de sensibilidade, conforme tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações críticas de tuberculostáticos empregadas nos testes de sensibilidade e a proporção crítica de mutantes resistentes esperados.

Drogas	Concentrações (µg/ml)	Proporções (%)
Isoniazida	0,2	1,0
Rifampicina	40,0	1,0
Pirazinamida	100,0	10,0
Etambutol	2,0	1,0

Fonte: Manual de bacteriologia da tuberculose, 3ª Ed, 2005.

Após a leitura do teste realiza-se o cálculo da porcentagem de bacilos resistentes pela fórmula:

$$\frac{\text{Número de colônias no tubo com fármaco} \times 100}{\text{Número de colônias no tubo controle}} = \% \text{ de Bacilos Resistentes}$$

As amostras são consideradas resistentes quando esta porcentagem foi superior ou igual à proporção crítica estabelecida para cada fármaco. Este teste pode ser realizado a partir de escarro positivo a baciloscopia (teste direto) ou a partir da cultura (teste indireto).

2.3.4.2 Método de microdiluição em caldo

Um certo número de novos métodos para testes de susceptibilidade a fármacos usados contra o *M. tuberculosis* foram descritos ao longo das duas últimas décadas (FRANZBLAU et al, 1998; SYRE et al., 2010; KUMAR et al., 2005; MARTIN et al., 2005). Recentemente, tem sido relatado que estes métodos de microdiluição são práticos, rápidos e uma ótima alternativa para a determinação de concentrações inibitórias mínimas (CIM) em laboratórios demicobacteriologia clínica (MARTIN et al., 2005).

2.3.4.3 Métodos moleculares

Os avanços em biologia molecular tornaram possível investigar os mecanismos genéticos da resistência aos fármacos, bem como caracterizar as mutações relacionadas à resistência aos diversos fármacos. Vários genes já foram identificados como responsáveis pela resistência aos principais medicamentos contra o *M. tuberculosis* (ROSSETTI et al., 2002).

A resistência para isoniazida parece estar associada a uma variedade de mutações que afetam um ou mais genes, como os que codificam para catalase-peroxidase (katG) a enzima enoyl-ACP redutase, envolvida na biossíntese do ácido micólico (inhA), a alkyl hidroperóxido redutase, envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (ahpC) e a enzima β -ketoacyl ACP syntase (kasA). Já para a rifampicina sabe-se que ela interage especificamente com a subunidade β da RNA polimerase e que mutações no locus rpoB conferem trocas conformacionais, impedindo uma ligação eficiente do fármaco e, conseqüentemente, a resistência. Para a pirazinamida analisa-se mutações no gene pncA, que codifica a enzima pirazinamidase, a qual converte o fármaco pirazinamida em sua forma ativa. As bases genéticas para a resistência ao etambutol estão associadas a alterações no gene embB (ROSSETTI et al., 2002).

2.4 Patogenia

O *M. tuberculosis* chega aos alvéolos, dentro de pequenas partículas de aerossol e é transportado para dentro de tecidos pelos fagócitos do hospedeiro, que agregados com outras células do sistema imunológico formam os granulomas que são as lesões características da tuberculose. Em indivíduos imunocompetentes, existem dois principais resultados iniciais da infecção: o desenvolvimento de tuberculose ativa ou a criação de uma infecção (latente) assintomática (CONNOLLY et al., 2007). Um microrganismo aeróbio de crescimento lento que possui uma grande capacidade de desenvolvimento de resistência. A população bacilar localiza-se em diferentes áreas do órgão afetado dependendo da fase de crescimento que se encontra o bacilo: os microrganismos em crescimento geométrico se encontram geralmente na parede da cavidade pulmonar onde há boa oferta de oxigênio presença de nutrientes e pH neutro; os de crescimento intermitente, encontram-se geralmente fora das células dentro de um granuloma onde ocorre necrose tecidual, e acúmulo de CO₂ e ácido láctico; finalmente os de crescimento lento ficam protegidos no interior de macrófagos (LOPES, 2000).

2.5 Tratamento

Levando-se em consideração o comportamento metabólico e localização do bacilo o esquema terapêutico anti-TB deve atender a três grandes objetivos: evidenciar atividade bactericida precoce, prevenir a emergência de bacilos resistentes e ter atividade esterilizante (CAMINERO, 2003). A atividade bactericida precoce é a capacidade de matar o maior número de bacilos o mais rapidamente possível, diminuindo a infectividade do caso-índice no início do tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). Atividade esterilizante é a capacidade de eliminar virtualmente todos os bacilos de uma lesão. A adequada esterilização de uma lesão é que impede a recidiva da tuberculose após o tratamento. Pacientes cujas lesões não estavam esterilizadas ao final do tratamento, manifestam recidiva da doença (BRASIL, 2010).

Cada população micobacteriana apresenta diferentes proporções de bacilos com resistência natural aos diferentes medicamentos anti-TB. Assim, a forma de se evitar a seleção de bacilos resistentes é a utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos anti-TB simultaneamente, uma vez que bacilos naturalmente resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro. (CONNOLLY et al., 2007).

Os fármacos anti-TB de primeira linha associados possuem as propriedades relacionadas anteriormente, sendo ativas em todas as populações bacilares sensíveis, quer intracavitárias, nos granulomas ou intracelulares. A rifampicina é o medicamento com maior poder esterilizante e juntamente com a isoniazida atua em todas as fases do crescimento bacteriano. A pirazinamida é ativa apenas em meio ácido (intracelular ou no interior dos granulomas) e o etambutol é bacteriostático, e utilizado em associação com medicamentos mais potentes para prevenir a emergência de bacilos resistentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006). Efeitos adversos são pouco frequentes e em geral não determinam a suspensão do tratamento. A hepatopatia ocorre raramente, ao contrário do que se pensava, não havendo necessidade de acompanhamento laboratorial. Queixas gástricas, urticária, prejuízo da memória, dificuldades no aprendizado, sonolência excessiva, insônia, alterações na caligrafia, entre outros, são também incomuns (GRUPO DE TRABALHO DAS DIRETRIZES PARA TUBERCULOSE DA SBPT, 2009).

2.5.1 Rifampicina

A rifampicina é um membro do grupo das rifamicinas, sendo um composto semi-sintético derivado de *Amycolatopsis rifamycinica*. É bactericida contra *M. tuberculosis* e várias outras espécies de micobactérias, incluindo *M. Bovis* e *M. Kansasi*, atuando através da inibição da DNA-polimerase dependente de RNA, bloqueando a transcrição. Entre os agentes de primeira linha, a rifampicina tem a atividade esterilizante mais potente, incluindo bacilos dormentes devido ao seu rápido início de ação (MITNIK et al., 2009).

2.5.2 Isoniazida

Quimicamente, a isoniazida é a hidrazida do ácido isonicotínico. Exerce uma ação bacteriostática nos bacilos em repouso e bactericida nos que se encontram em fase de divisão rápida, como nos bacilos intracelulares. Porém é o primeiro fármaco que torna os microrganismos resistentes quando aplicado a um regime de seis meses (CHIANG et al., 2010). O seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido mas acredita-se que a catalase-peroxidase do *Mycobacterium* transforma a isoniazida num composto biologicamente ativo que tem capacidade de inibir a síntese dos ácidos micólicos que fazem parte da parede da micobactéria (HALL et al., 2009).

2.5.3 Pirazinamida

A pirazinamida é uma pirazina sintética análoga da nicotinamida. É um pro-fármaco que acredita ser bioativado por amidase em ácido pirazinóico que tem ação bactericida inibindo a síntese dos ácidos micólicos, inibindo o transporte celular. Possui atividade preferencial por bacilos que não estão replicando, por isso a sua ação esterilizante. A sua ação só ocorre no ambiente ácido da lesão caseosa ou nos fagolisossomas dos macrófagos (ZHANG et al., 2003).

2.5.4 Etambutol

O etambutol é um agente bacteriostático obtido por síntese: dextro-2,2'-(etilenodiamina)-di-1-butanol. Surgiu em 1968 vindo ocupar o lugar do ácido p-aminossalicílico. Tem capacidade de atuar nas estirpes resistentes à isoniazida e à estreptomicina. Afeta a síntese de componentes celulares inibindo a transferase de arabinose envolvida na síntese da parede celular (JONSSON et al., 2011).

2.6 Resistência aos antimicrobianos

Em Microbiologia clínica, o mecanismo mais freqüente de resistência é a presença de genes plasmidiais que controlam a síntese de enzimas modificadoras dos antimicrobianos que os tornam inativos na sua ação antibacteriana. No caso do *M. tuberculosis*, não há indicação de uma transferência horizontal de genes, isto é, aquisição de resistência por plasmídeos ou transposons e o mecanismo de resistência é exclusivamente por mutações. O mecanismo clássico pelo qual a mutação confere resistência é aquele que ocorre no gene que codifica para o alvo do fármaco, diminuindo a habilidade desta se ligar à enzima (BRASIL, 2008).

Os pacientes que são infectados com cepas resistentes aos fármacos podem desenvolver TB resistente aos medicamentos antes do tratamento (resistência primária) ou durante o tratamento anti-TB (resistência adquirida). Os medicamentos anti-TB impõe pressão de seleção na população de *M. tuberculosis* resistentes, assim progressivamente mais bacilos mutantes emergem em uma monoterapia (CHIANG et al., 2010).

Uma alta carga bacteriana, está associada com um aumento da freqüência de microrganismos fenotipicamente resistente aos fármacos. Quanto maior a carga bacteriana,

mais provável que entre elas existam mutantes geneticamente resistentes (CONNOLLY et al., 2007).

O problema fundamental no tratamento da TB é a longa duração da terapia necessária para a cura, que é principalmente ocasionado pelos fatores relacionados acima (CONNOLLY et al., 2007). Outro desafio importante refere-se aos fármacos utilizados no tratamento: ensaios clínicos em andamento, provavelmente, não identificarão novos medicamentos contra a tuberculose nos próximos dez anos. Torna-se de necessidade premente o uso racional e adequado da rifampicina e da isoniazida (DIVISÃO DE TUBERCULOSE, 2010).

Além disso, é importante salientar que quando os medicamentos para a TB são ofertados ao paciente separadamente podem ocorrer erros na administração. Infelizmente, os pacientes às vezes optam por apenas um medicamento (monoterapia) quando mais de um fármaco é prescritos. Isso ocorre devido a uma falta temporária de uma fonte de um ou mais medicamentos, erros de dispensação, o fornecimento de um medicamento que dura mais que o fornecimento de outros medicamentos, perda de um medicamento, mal-entendidos; e decisões deliberadas dos pacientes a tomar apenas um medicamento devido a sintomas percebidos ou reais associados com o outro medicamento. Quando um paciente adota a monoterapia por uma destas razões, a resistência tende a manifestar (MOULDING et al., 1995).

2.7 Mudanças no tratamento da tuberculose

Segundo nota técnica expedida pelo Ministério da Saúde foram implementadas mudanças no tratamento da tuberculose pelo PNCT/MS. Essas mudanças aplicam-se aos indivíduos com 10 anos ou mais (adolescentes e adultos) (BRASIL, 2009). A primeira mudança consiste na introdução do etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do esquema básico. Este tem como justificativa a constatação do aumento da resistência primária a isoniazida (de 4,4 para 6,0%) e a resistência primária a isoniazida associada à rifampicina (de 1,1 para 1,4%). Tais alterações foram observadas no II Inquérito Nacional de resistência aos fármacos anti-TB conduzido em 2007-2008, em comparação com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado no período de 1995 a 1997 (BRASIL, 2009).

A segunda mudança consiste em introduzir a apresentação em comprimidos com dose fixa combinada (DFC) dos 4 fármacos (4 em 1) para a fase intensiva do tratamento. Os comprimidos serão formulados com doses reduzidas de isoniazida e pirazinamida em relação

às atualmente utilizadas no Brasil. Estes comprimidos contém 159 mg de rifampicina, 75 mg de isoniazida, 400 mg de pirazinamida e 275 mg de etambutol. A fase de manutenção continuará sendo composta por dois fármacos, rifampicina e isoniazida, nas doses e apresentações usuais, conforme tabela explicativa (Tabela 2), até que estejam disponíveis os comprimidos em dose fixa combinada de rifampicina e isoniazida (150/75 mg) no Brasil (BRASIL, julho 2010).

Tabela 2 - Esquema básico para o tratamento da tuberculose em adultos e adolescentes.

Regime	Fármaco	Faixa de peso	Unidades/dose	Duração (meses)
	RHZE			
2RHZE	150/75/400/275			
Fase intensiva	Comprimido em dose fixa combinada	20 a 35 Kg 36 a 50 Kg >50 Kg	2 comprimidos 3 comprimidos 4 comprimidos	2
	RH			
Fase de manutenção	300/200 ou 150/100 cápsula	20 a 35 Kg 36 a 50 Kg >50 Kg	1 cápsula 300/200 1 cápsula 300/200 +1 cápsula 150/100 2 cápsulas 300/200	4

Fonte: Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde

R: rifampicina; H: isoniazida; Z: pirazinamida; E: etambutol.

O esquema básico é indicado para os casos novos (paciente sem uso prévio de medicamentos anti-TB ou com uso inferior a 30 dias) de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite), infectados ou não pelo vírus HIV e no retratamento. Em todos os casos de retratamento, preconiza-se a solicitação de cultura, identificação e teste de suscetibilidade (DIVISÃO DE TUBERCULOSE, 2010).

2.7.1 Benefícios do novo tratamento

Ao impedir a monoterapia e facilitar a ingestão de doses adequadas dos fármacos anti-TB, espera-se que estas ajudem a prevenir o aparecimento de resistência aos fármacos. Além dessas, podemos citar várias outras vantagens para a aplicação da DFC: simplificação do tratamento, redução dos erros de prescrição, adesão do paciente e o respeito dos profissionais de saúde, redução da supervisão do tratamento, simplificação da gestão de oferta de fármacos, facilitar o cálculo das necessidades do medicamento, garantir a disponibilidade de medicamentos de alta qualidade e garantir a entrega ao paciente da dose correta de todos os

fármacos. Além disto, a DFC não produz mais efeitos adversos que as equivalentes associações de fármacos formulados sepradamente (BLOMBERG e FOURIE, 2003).

OBJETIVOS

1 Objetivo Geral

Verificar o perfil de suscetibilidade a agentes tuberculostáticos de *M. tuberculosis* isolados no Hospital Universitário de Santa Maria no ano de 2010.

2 Objetivos Específicos

2.1 Classificar em quatro diferentes grupos os bacilos isolados de pacientes através dos métodos clássicos;

2.2 Identificar por reação em cadeia da polimerase (PCR) os isolados de *M. tuberculosis*;

2.3 Avaliar o perfil de suscetibilidade dos isolados de *M. tuberculosis* frente aos tuberculostáticos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, separadamente pelo método das proporções e em associação pelo método de microdiluição em caldo.

2.4 Comparar a suscetibilidade dos isolados de *M. tuberculosis* frente aos tuberculostáticos da dose fixa combinada, agindo separadamente ou associados.

MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. O **manuscrito 1** está disposto na forma que foi enviado para publicação à revista científica **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, como comunicação curta. O **manuscrito 2** está disposto na forma que será submetido para publicação.

1 Manuscrito I

Caracterização de micobactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Characterization of mycobacteria isolated at University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Vanessa Albertina Agertt¹, Tanise Vendruscolo Dalmolin¹, Pauline Cordenonsi Bonez¹, Caren Rigon Mizdal¹, Jaciane Baggiotto Marques¹, Vanessa da Costa Flores¹, Adenilde Salla², Marli Matiko Anraku de Campos¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria

²Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Universitário de Santa Maria Universidade Federal de Santa Maria

Resumo

Avaliou-se a prevalência de micobactérias não-tuberculosas (MNT) em relação ao total de casos de micobacterioses identificadas em pacientes no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) entre os anos de 2008 e 2010. Entre as amostras positivas para o gênero

Mycobacterium, 67% eram do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e 33% foram classificadas como micobactérias não tuberculosas (MNT). Este estudo vem contribuir com a epidemiologia das micobacterioses, uma vez que os pacientes infectados por MNTs necessitam de um tratamento e acompanhamento diferenciado dos infectados por CMTBs.

Palavras chaves: Micobactéria não-tuberculosa, *Mycobacterium tuberculosis*, classificação, fenotipagem, incidência, sul do Brasil.

Abstract

This study evaluated the incidence of nontuberculous mycobacteria (NTM) in relation to all cases of mycobacteria identified in patients in Santa Maria University Hospital (HUSM) between 2008 and 2010. Among the positive samples for the genus *Mycobacterium*, 67% of the *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) and 33% were classified as NTM. This work should serve as a warning to health professionals to establish new diagnostic criteria for correct identification of the causative organism of mycobacteriosis, since patients infected with NTMs require a different treatment and monitoring of those infected with MTBs.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, classification, phenotype, incidence, Southern Brazil.

Introdução

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e outras denominadas de micobactérias não tuberculosas (MNT)⁸. Os protocolos para tratamento da tuberculose e para tratamento das infecções causadas pelas MNT diferem; assim o diagnóstico diferencial da tuberculose e MNT são essenciais para estabelecer o tratamento^{15,5}.

Em países de baixa e média renda, onde ocorre mais de 90% dos casos de TB, o diagnóstico é realizado principalmente pelo método de baciloscopia de bacilos álcool-ácido resistentes¹². Até o momento, o diagnóstico de certeza da tuberculose é realizado através de cultura do material da lesão com isolamento e identificação do bacilo². É esta identificação dos bacilos que muitos laboratórios deixam de fazer, seja por falta de recursos para realizar técnicas moleculares ou pelo grande tempo destinado aos métodos fenotípicos.

Este estudo é baseado em pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) – Santa Maria /RS onde atualmente o diagnóstico diferencial das

micobacterioses não é realizado na rotina, apenas nos casos de falência do tratamento. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de MNT em relação ao total de casos de micobactérias identificadas em pacientes no HUSM entre os anos de 2008 e 2010.

Métodos

Este estudo foi realizado com amostras com cultura positivas para micobactérias provenientes do laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria (LAC-HUSM), localizado no município de Santa Maria, RS, Brasil no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2010. As informações sobre as amostras positivas incluíram: sexo, sítio isolado e resultados de baciloscopia e cultura. As técnicas para baciloscopia e cultura foram as rotineiramente utilizadas pelo LAC-HUSM e padronizadas conforme normas e recomendações descritas no Manual de Bacteriologia da Tuberculose do Ministério da Saúde⁴.

As amostras pulmonares e extrapulmonares foram classificadas por métodos fenotípicos. A classificação das MNT e as do CMTB foram realizadas no laboratório de Micobacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria - DACT/UFSM, para avaliação do tempo de crescimento, da produção de pigmento e do crescimento na presença de agente inibidor⁴. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFSM pelo CAAE número 0104.0.243.000-11.

Resultados

As micobactérias foram classificadas segundo Runyon, em 4 grupos: grupo I (Fotocromogênicas), grupo II (Escotocromogênicas), grupo III (Não-cromogênicas) e grupo IV (Crescimento rápido). Os espécimes identificados como do grupo III foram separados do complexo *M. tuberculosis* pela suscetibilidade ao ácido para-amino benzóico (PNB).

Dos 4.603 pedidos realizados no período do estudo 194 tiveram baciloscopia e cultura positiva. Entre as amostras positivas para o gênero *Mycobacterium*, 67% eram do complexo *M. tuberculosis* e 33% foram classificadas como MNT, conforme figura 1.

Das 194 micobactérias isoladas 70% foram isoladas de pacientes do sexo masculino, destas 67% eram do complexo *M. tuberculosis* (MTB) e 33% eram MNT. Já entre os isolados

de MNT 70% eram provenientes de pacientes do sexo masculino. No figura 2 estabelece a ocorrência das MTB e MNT em relação aos sítios de isolamento das amostras positivas.

Discussão

Nos últimos 15 anos o número de espécies clinicamente significantes do gênero *Mycobacterium* dobraram⁹. Como as micobacterioses não são de notificação obrigatória no Brasil, a elevada incidência dessas doenças relatadas em alguns trabalhos não podem ser comprovadas com registros oficiais³. Os estudos sobre o assunto ainda são escassos e os que existem diferem quanto à população analisada e o tipo de amostras clínicas, sendo assim difícil de comparar os resultados obtidos¹⁶.

Entre os estudos que revelaram a porcentagem de MNT, os realizado no Rio de Janeiro^{7,14} são os que apresentaram valores mais próximos ao do nosso estudo (prevalência de MNT 33%), apresentando 45% e 34,3%²⁴ de MNT. Porém, estes estudos foram realizados no período de 2000 a 2002. Em um estudo mais recente realizado em São José do Rio Preto, SP entre 1996 e 2005¹³ mostrou uma incidência de 24,4% de MNT, corroborando com nosso estudo.

Segundo MATOS et al, 2004¹⁰, uma maior prevalência de MNT em estudo realizado na Bahia, Brasil foi entre pacientes do sexo masculino (68,4%) assim com o nosso estudo (70%), porém a porcentagem de MNT isoladas no período de 1998 a 2003 foi de apenas 8,2%, diferentemente da porcentagem encontrada neste trabalho (33%). Esta discrepância pode ter ocorrido devido ao fato deste estudo ter utilizado métodos mais rigorosos para diferenciar colonização de infecção por MNTs, como o uso dos critérios da *American Thoracic Society (ATS)*⁶.

As diferentes incidências observadas nos estudos citados acima, incluindo o realizado por nosso grupo de pesquisa, podem ter ocorrido devido ao fato de nosso estudo ter sido realizado com amostras respiratórias e provenientes de outros sítios o que não ocorreu em todos os estudos citados. Outra explicação plausível seria a distribuição geográfica das espécies de MNT em nosso vasto país com diversos fatores ambientais^{11,1}, justificando também as diferenças nas idades das populações estudadas. Pessoas mais velhas tendem a ter doenças pré-existentes de pulmão, sendo este um fator importante de colonização e/ou infecção de MNT.

Não foram encontrados estudos que utilizaram como base apenas a classificação de MNT (fig. 1) sem a identificação das devidas espécies, sendo assim uma limitação de nosso

estudo. Porém como nosso objetivo foi alertar sob a existência de MNT em nossa região e que muitas vezes não são percebidas, acreditamos termos atingido-o com estes resultados. Não houve diferenças entre o tipo de amostra em que as MTB e MNT foram isoladas, apenas que a maior ocorrência de ambas foi em amostras de escarro. Isto, provavelmente, deve-se ao fato de ser uma amostra comum nas solicitações médicas, pois se limita a ser um processo médico não invasivo.

Apesar das limitações do estudo podemos concluir que a prevalência de MNTs no HUSM é elevada e pode ser responsável pela falência no tratamento de alguns pacientes considerados portadores apenas do *M. tuberculosis*. Este estudo vem contribuir com a epidemiologia das micobacterioses uma vez que os pacientes infectados por MNTs necessitam de um tratamento e acompanhamento diferenciado dos infectados por MTBs.

Referências

1. BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D. C. Micobactérias “nãotuberculosas” no Brasil. *Bol Pneumo San.*v. 8 p. 23-32, 2000.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de referencia Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5. ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 436 p.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil, 2010.
5. BRASIL. Secretaria Estadual da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento. São Paulo: Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo; 2005.
6. _____.Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. *Am J Respir Crit Care Med.* v. 156 p. 1-25, 1997.

7. FERREIRA, R. M.; et al. Non-tuberculous mycobacteria I: one year clinical isolates identification in Tertiary Hospital Aids Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in pre highly active antiretroviral therapy era. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . v. 97 n. 5 p.725-9, 2002.
8. GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOTT, B. A. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. v. 175 n. 4 p. 367-416, 2007.
9. HALL, L.; ROBERTS, G. D. Non-molecular identification of nontuberculous mycobacteria in the clinical microbiology laboratory: What's the real deal? *Clin Microbiol News*.v. 28 n. 10 p. 73-80, 2006.
10. MATOS, E. D; et al. Nontuberculosis Mycobacteria at a Multiresistant Tuberculosis Reference Center in Bahia: Clinical Epidemiological Aspects. *Brazilian J Infec Dis*. v. 8 n. 4 p. 296-304, 2004.
11. O'BRIEN, R. J.; GEITER, L. J.; SNIDER, D. E.. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Results from a national survey. *Am Rev Respir Dis*; v. 135 p. 1007-1014, 1987.
12. PAI, M.; KALANTRI, S.; DHEDA, K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis. Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev. Mol. Diagn*. v. 6 p. 423-432, 2006.
13. PEDRO, H. S. P.; et al. Nontuberculous mycobacteria isolated in São José do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005. *J Bras Pneumol*. v. 34 n. 11 p. 950-955, 2008.
14. SENNA, S. G.; et al. Identificação e análise de MNTs causadoras de infecção no Hospital Universitário - HUCFF/UFRJ no Rio de Janeiro. *J Bras Pneumol*. v. 32 n. 3 p. 135-158, 2006.
15. SONG S, et al Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. *J Microbiol Method*. v. 77 p. 165–177, 2009.
16. UEKI, S. Y.; et al. Micobactérias não tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med Lab*. v. 41n. 1p. 1-8, 2005.

Figuras

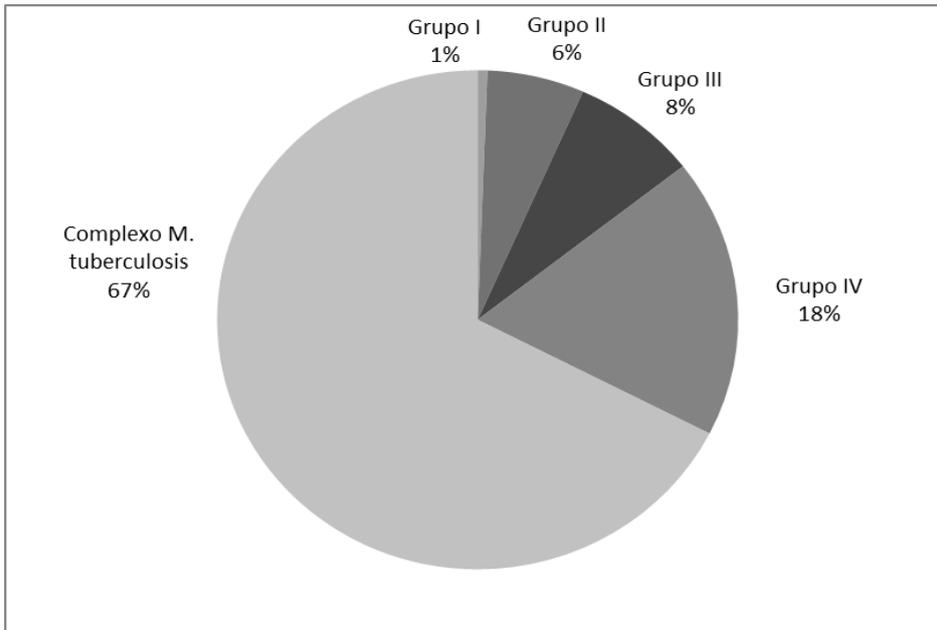


Figura 1 – Porcentagens da classificação das micobactérias isoladas entre 2008 e 2010.

Figure 1 – Percentages of classification of mycobacteria isolated between 2008 and 2010.

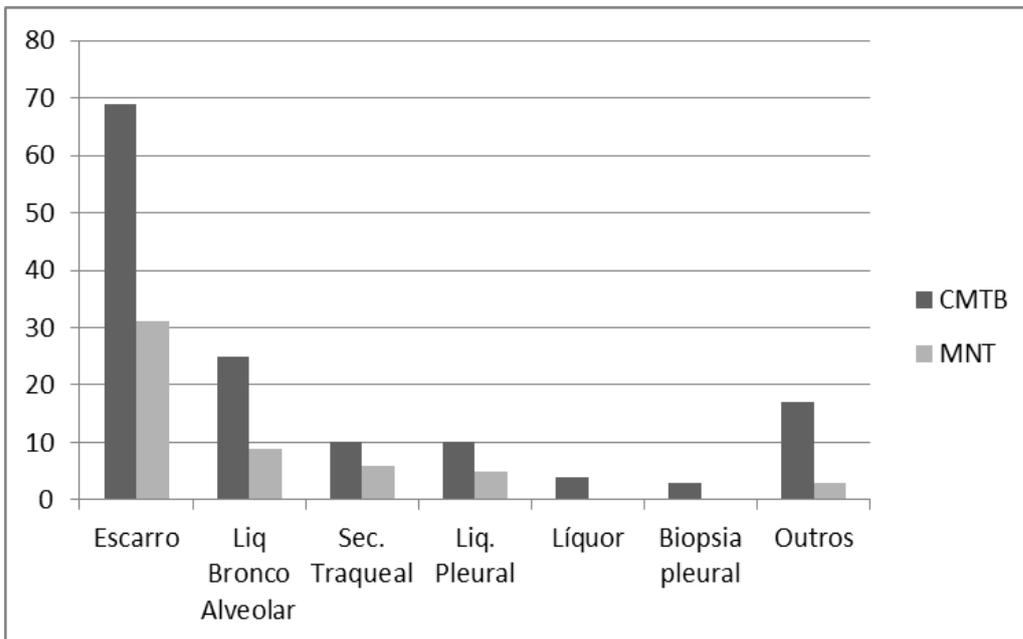


Figura 2 – Distribuição das micobactérias conforme sítios isolados.

Figure 2 – Distribution of mycobacteria as isolated sites.

2 Manuscrito II

Avaliação do perfil de suscetibilidade de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* frente aos fármacos da dose fixa combinada.

Vanessa Albertina Agertt¹, Tanise Vendruscolo Dalmolin¹, Pauline Cordenonsi Bonez¹, Caren Rigon Mizdal¹, Jaciane Baggiotto Marques¹, Vanessa da Costa Flores¹, Marli Matiko Anraku de Campos¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria

RESUMO

O sistema de tratamento para a tuberculose recomendado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose/Ministério da Saúde (PNCT/MS) foi modificado em 2010. As principais mudanças propostas pelo Comitê Técnico Assessor do PNCT/MS foram: a introdução do etambutol na fase de ataque e a adoção da associação dos fármacos em forma de comprimidos, com doses fixas combinadas (DFC) 4 em 1, para a fase de tratamento intensivo, e 2 em 1, para fase de manutenção. Devido à grande incidência da tuberculose no Brasil e no mundo, a emergência de cepas resistentes e a implantação de novas terapias pelo Ministério da Saúde, este trabalho objetivou comparar a suscetibilidade dos isolados de *M. tuberculosis* do Hospital Universitário de Santa Maria frente aos tuberculostáticos da dose fixa combinada agindo separadamente ou associados. A suscetibilidade aos antimicrobianos associados (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) foi avaliada através do método de microdiluição em caldo. Apesar do encontro de várias cepas resistentes a um, dois ou três fármacos, quando testadas isoladamente, nenhuma cepa foi considerada resistente na associação. Este fato vem de encontro ao conceito da DFC a qual pretende unir os quatro medicamentos anti-TB para combater a resistência dos bacilos.

INTRODUÇÃO

Atualmente há um acréscimo na incidência de cepas de *M. tuberculosis* resistente a múltiplos fármacos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011); esta resistência é

causada, entre outros fatores, a não aderência de pacientes ao tratamento da tuberculose, já que este é longo e com muitos efeitos colaterais (MSHANA et al., 1998). Além disso, o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) vem contribuindo para o aumento no número de casos e da gravidade da doença causada pelo bacilo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O impacto clínico da resistência é imenso, sendo caracterizado por aumento nos custos do tratamento, bem como maior morbidade e mortalidade. Nos dias atuais o abuso dos antimicrobianos convencionais para o tratamento de infecções microbianas tem aumentado os índices de resistência (JUNEYOUNG et al., 2009).

A TB geralmente pode ser tratada com um curso padrão de quatro fármacos, também chamado de primeira linha de medicamentos anti-TB. Se estes agentes são mal utilizados ou mal administrados, os pacientes podem desenvolver tuberculose resistente a múltiplas drogas (MDR-TB). Uma MDR-TB requer muito tempo para ser tratada com medicamentos de segunda linha, que são mais caros e apresentam mais efeitos colaterais. A XDR-TB, a abreviação para tuberculose extremamente resistente aos medicamentos, pode desenvolver-se quando os medicamentos de segunda linha também são mal utilizados ou mal administrados e, portanto, tornam-se ineficazes. Como XDR-TB são resistentes a fármacos de primeira e de segunda linha, as opções de tratamento ficam muito limitadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O problema fundamental no tratamento da TB é a longa duração da terapia necessária para a cura, que é principalmente ocasionado pelos fatores relacionados acima (CONNOLLY et al., 2007). Outro desafio importante refere-se aos fármacos utilizados no tratamento: ensaios clínicos em andamento, provavelmente, não identificarão novos medicamentos contra a tuberculose nos próximos dez anos. Torna-se de necessidade premente o uso racional e adequado da rifampicina e da isoniazida (DIVISÃO DE TUBERCULOSE, 2010).

O sistema de tratamento para TB recomendado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose/Ministério da Saúde (PNCT/MS) desde 1979, com a introdução da rifampicina e unificações de ações, foi modificado. As principais mudanças propostas pelo Comitê Técnico Assessor do PNCT/MS são: introduzir um quarto fármaco, o etambutol, na fase de ataque e adotar a associação dos fármacos em forma de comprimidos, com doses fixas combinadas 4 em 1 (159mg de rifampicina, 75mg de isoniazida, 400mg de pirazinamida e 275mg de etambutol), para a fase de tratamento intensivo, e 2 em 1 (150mg de rifampicina e 75mg de isoniazida), para fase de manutenção. (GRUPO DE TRABALHO DAS DIRETRIZES PARA TUBERCULOSE DA SBPT, 2009)

Devido à grande incidência da tuberculose no Brasil e no mundo, a emergência de cepas resistentes e a implantação de novas terapias pelo Ministério da Saúde, justifica-se a avaliação do perfil de suscetibilidade a drogas anti-TB dos isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria.

MÉTODOS

Os bacilos isolados de pacientes com tuberculose foram provenientes do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria – LAC-HUSM, no período de janeiro a dezembro de 2010. Foram analisadas as culturas de amostras coletadas de pacientes com suspeita de tuberculose conforme a orientação do Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 2005) que obtiveram baciloscopia e cultura positiva.

Das culturas positivas foi retirada uma pequena porção para repique e re-isolamento em meio de Lowestein-Jensen (LJ). A partir desta cultura foram realizados testes para a diferenciação entre micobactérias não-tuberculosas e prováveis *Mycobacterium tuberculosis* (BRASIL, 2005). Os espécimes identificados como do grupo III foram repicados para LJ (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.) contendo ácido p-nitrobenzóico (PNB 500 µg/ml), o qual separa os membros do complexo *M. tuberculosis* que são sensíveis, das demais micobactérias que são resistentes, excetuando algumas estirpes de *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. goodii* e *M. marinum*.

Após as amostras serem classificadas como do “complexo *M. tuberculosis*” elas foram identificadas por técnicas moleculares. As amostras foram examinadas para a presença da inserção IS6110 (EISENACH et al., 1992). Para amplificar a inserção IS6110 foi utilizado as seqüências de primers 5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCCGG-3' e 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'(Invitrogen™), originando como produto com fragmentos de comprimento 123 pares de base (pb). Os reagentes foram adicionados para um tubo de microcentrifuga de 0,2 mL: 2,5 µL de 10 X PCR buffer, 4µL de agrupados de dNTPs (1,25 mM cada), 0,6 µL de porções de 5µM de cada primer, 0,125 µL de Taq polimerase 2,5 U/ µL(Invitrogen™), 1µL de DNA modelo e água até volume final de 25µL. As condições do ciclo foram como segue: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos seguido por 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos) e 72°C por 10 minutos em termociclador (Applied Biosystems Veriti™ 96 well Thermal Cycler). 5 µL do subproduto foi submetido à eletroforese em 1% (p/v) de gel de agarose sob voltagem constante de 80V por aproximadamente 20 minutos seguido de 100V por 40 minutos. Utilizou-se banho de

brometo de etídio (0,5µg/mL) por 10 minutos antes das bandas de DNA serem visualizadas em trasiluminador UV (UVtrans UVT-312). A extração de DNA genômico foi realizada segundo Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. (BASIL, 2008).

Os cultivos confirmados como *M. tuberculosis* e cepa padrão H37Rv foram avaliados quanto à suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) separados segundo método das proporções (MP) descrito por Canetti, et al (1963) e associados conforme a dose fixa combinada.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos isolados e em associação (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (Sigma®) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo (MMC) adaptado (NCCLS, 2003; FRANZBLAU et al, 1998; SYRE et al., 2010). A rifampicina foi dissolvida em metanol e os demais fármacos em água MilliQ estéril, após foram diluídos em MD7H9 até as concentrações desejadas. A rifampicina e a isoniazida foram testadas nas concentrações de 0,25 a 8 µg/mL, a pirazinamida nas concentrações de 25 a 800 µg/mL e o etambutol nas concentrações de 4 a 128 µg/mL. Os quatro fármacos foram testados em associados nas mesmas concentrações citas acima, preparando uma solução onde a concentração de cada fármaco fosse a mesma utilizada nos teste dos fármacos isolados. Para a suspensão bacteriana foi utilizado meio base de Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase) (Difco Laboratories, Detroit, Mich) e 0,2% glicerol (MD7H9) MD7H9, que foram incubadas a 35°C por 7 dias em tubos contendo pérolas de vidro de 2mm de diâmetro, para posterior homogeneização e desagregação em agitador tipo vortex. A suspensão bacteriana foi ajustada na escala 1 de MacFarland e então diluída 1/25 em MD7H9 no momento do uso.

O teste de microdiluição em caldo foi realizado em placas de cultura de célula de 96 poços. O crescimento ou não de colônias foi observado pelo aparecimento de pontilhado branco, não sendo utilizados corantes. Foram consideradas cepas resistentes as que possuíram crescimento superior as concentrações de 1 µg/mL para a rifampicina e isoniazida, 16 µg/mL para o etambutol e 100 µg/mL para a isoniazida e 1/1/16/100 µg/mL para a associação 4 em 1.

O projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo CAAE (Certificado de apresentação para Apreciação Ética) número 0104.0.243.000-11.

RESULTADOS

Todos os isolados clínicos que não evidenciaram crescimento no meio de LJ com PNB também mostraram reação positiva para a inserção IS6110 que identifica as micobactérias do “complexo *M. tuberculosis*”. Dois dos isolados classificados como sendo do grupo III, que obtiveram crescimento no LJ com PNB tiveram reação negativa para a inserção IS6110.

Através do método das proporções foram encontradas 18 isolados resistentes, entre eles 10 resistentes a somente um fármaco, 5 resistentes a dois fármacos e 3 resistentes a três fármacos. A figura 1 evidencia estas proporções. Através do método de microdiluição em caldo foram encontrados 28 isolados resistentes, entre eles 16 resistentes a somente um fármaco, 4 resistentes a dois fármacos e 8 resistentes a três fármacos. A figura 2 melhor apresenta estas proporções.

Os dados usados para calcular a correlação entre os métodos estão expressos nas tabelas 1. A correlação entre os métodos estão ilustradas nas figuras 3 a 6.

Os isolados quando testados frente aos quatro fármacos associados foram considerados todos sensíveis. 38 isolados evidenciaram $CIM \leq 0,25/0,25/4/25 \mu\text{g/mL}$, 3 tiveram CIM igual a $5/5/8/50 \mu\text{g/mL}$ e 1 isolado teve CIM igual a $1/1/16/100$. A maioria destes isolados (3 isolados) apresentaram resistência a isoniazida, etambutol e pirazinamida quando os fármacos foram testados separadamente pelo MMC.

DISCUSSÃO

A identificação dos isolados clínicos como sendo do “complexo *M. tuberculosis*” foi satisfatória, pois 100% dos isolados caracterizados pelo método clássico (LJ com PNB) também foram positivos para a inserção IS6110. O “complexo *M. tuberculosis*” é composto por *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*; sendo os dois últimos encontrados em baixa frequência em nosso país (BRASIL, 2005). Como o *M. bovis* necessita de condições mais exigentes para crescer em meio de cultura acreditamos que nossos isolados sejam de *M. tuberculosis*, já que o meio utilizado para o crescimento das amostras se tratou de LJ não enriquecido para o *M. bovis*.

Os testes de suscetibilidade realizados em meios líquidos são comprovadamente mais sensíveis do que os que utilizam meios sólidos. Isso acontece, pois em métodos de meio sólido usa-se apenas uma concentração de fármaco ao passo que nas técnicas de meio líquido é possível utilizar várias concentrações aumentando assim as possibilidades de avaliação.

Foram encontrados quatro isolados clínicos resistentes a rifampicina pelo método das proporções, mas acreditamos se tratarem de falso-positivo já que no método de microdiluição

em caldo estes isolados apresentaram CIMs inferiores a 0,25 µg/mL (Figura 3). Isso pode ter ocorrido pois ao coagular o meio de LJ podem ocorrer perdas pontuais da atividade da rifampicina.

Sete cepas foram consideradas sensíveis a isoniazida pelo método de microdiluição em caldo, mas resistentes no método das proporções (Figura 4). Este fato pode ser explicado, pois estas cepas apresentaram sensibilidade com $CIM \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ e no método das proporções a concentração usada no meio de LJ foi de 0,2 µg/mL, assim os valores de CIM devem estar entre 0,2 e 0,25 µg/mL. Estes isolados foram considerados sensíveis.

Quatro cepas foram consideradas sensíveis ao etambutol pelo método de microdiluição em caldo, mas resistentes no método das proporções (Figura 5). Este fato pode dever-se as cepas apresentaram sensibilidade com $CIM \leq 4 \mu\text{g/mL}$ e no método das proporções a concentração usada no meio de LJ foi de 2 µg/mL, assim os valores de CIM devem estar entre 2 e 4 µg/mL. Estes isolados foram considerados sensíveis.

Apesar do valor do índice kappa (κ) ter sido satisfatório (Tabela 1) detectou-se cepas resistentes a pirazinamida pelo método de microdiluição em caldo que não corresponderam com o método das proporções (Figura 6). Este fato pode ter ocorrido pois a pirazinamida possui sua ótima eficácia contra os microrganismos quando em pH ácido, o qual não foi observado no teste de microdiluição em caldo, isto ocorreu pois utilizamos uma referência que comprova que, usando ponto de corte em 100µg/ml de pirazinamida não há alterações nos resultados por conta do pH (SYRE et al.,2010). Segundo Zhang et al., (2003) o *M. tuberculosis* possui dificuldades em manter o seu pH interno neutro em condições ambientais de pH ácido. O acúmulo de ácido fraco poderia levar a interrupção da força motriz de prótons que é necessária para o transporte de muitas substâncias nutrientes para as células bacterianas. Porém, ácidos fracos que podem estar presentes durante o processo de inflamação têm influência sobre a atividade da pirazinamida *in vitro*. A exposição durante um tempo curto de menos de 3-5 dias dificilmente mostra qualquer atividade de pirazinamida. Este tempo é necessário para converter o pró-fármaco pirazinamida ao ácido pirazinóico o qual irá agir contra o microrganismo (WADE & ZHANG, 2006). Assim acreditamos que os testes *in vitro* para a pirazinamida ainda necessitam de mais estudos para se estabelecer uma melhor especificidade dos métodos, inclusive o realizado neste estudo que evidenciou um valor de falso-positivos elevado quando comparado com o método de referência.

A maioria dos trabalhos demonstra elevada ocorrência de resistência a rifampicina (ROSMAN et al., 2007; WANG et al., 2010; SOUZA et al., 2006; BARROSO et al., 2001). Porém em um estudo realizado no Mato Grosso do Sul, não foram encontrados isolados

clínicos com resistência primária a rifampicina (MARQUES et al., 2010). Os isolados clínicos utilizados em nossa pesquisa são provenientes de pacientes que nunca tiveram contato com os medicamentos para o tratamento da TB, o que justifica nossos achados.

Apesar da detecção de várias cepas resistentes a um, dois ou três fármacos quando testados separadamente pelo MMC, quando testadas frente aos quatro fármacos associados, por esse mesmo método, nenhuma cepa foi considerada resistente. Este fato vem ao encontro do conceito da DFC o qual pretende unir os quatro medicamentos anti-TB para combater a resistência dos bacilos. Como já foram realizados estudos que mostram a bioequivalência entre os fármacos da DFC (AGRAWAL et al., 2002) acreditamos que as mudanças no tratamento da tuberculose pelo PNCT/MS servirão para combater as cepas de *M. tuberculosis* resistentes a primeira linha de medicamentos utilizadas contra a TB.

CONCLUSÃO

O MMC mostrou-se ser um método rápido, de fácil realização e bem correlacionado com o MP, considerado padrão ouro para métodos de suscetibilidade de micobactérias. Este estudo também veio afirmar as mudanças no tratamento da TB pelo PCNT/MS, pois mostrou que cepas resistentes a um dois ou três fármacos são sensíveis a estes quando são associados em uma dose fixa combinada.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S. et al. Assessment of bioequivalence of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 233 p. 169–177, 2002.
- BARROSO, E. C.; et al. Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. **J Pneumol**. v. 27 n. 6 p. 310-314, 2001
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de referencia Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2005.
- CONNOLLY, L. E.; EDELSTEIN, P. H.; RAMAKRISHNAN, L. Why Is Long-Term Therapy Required to Cure Tuberculosis? **Plos med** v. 4 n. 3 p. 432-445, 2007.

DIVISÃO DE TUBERCULOSE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil Mudanças no tratamento da tuberculose Informes Técnicos Institucionais **Rev Saúde Pública**. v. 44 n. 1 p. 197-199, 2010.

EISENACH, K. D. et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Dis**. v. 161 p. 977-981, 1992.

FRANZBLAU, S.G. et al. Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36 n. 2 p.362-366, 1998.

GRUPO DE TRABALHO DAS DIRETRIZES PARA TUBERCULOSE DA SBPT. III **Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia Comissão de Tuberculose da SBPT**. J Bras Pneumol. v. 35 n. 10 p. 1018-1048, 2009.

JUNEYOUNG, L. et al. Antibacterial and Synergistic Activity of Isocryptomerin Isolated from *Selaginella tamariscana*. **J. Microbiol. Biotechnol**. v. 19 n. 2 p. 204–207, 2009.

MARQUES, M.; et al. Drug resistance profile of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, 2000-2006. **J Bras Pneumol**. v. 36 n. 2 p. 224-231, 2010.

MSHANA, R. N. et al. Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for Rappid Detection of Rifanpin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**. v. 30 n. 5 p. 1214-1219, 1998.

NCCLS, **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard** – Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087–1898 USA, 2003.

ROZMAN, L.M.;et al. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in HIV patients in Baixada Santista, São Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública**. v. 23 n. 5 p. 1051-1059, 2007.

SOUZA, M. B.; et al. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* at a referral center for infectious diseases in the state of Minas Gerais, Brazil: sensitivity profile and related risk factors. **J Bras Pneumol.** v. 32 n. 5 p. 430-472, 006.

SYRE, H.; OVREA, K.; GREWAL, H. M. S. Determination of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide in liquid and solid media assessed by a colorimetric nitrate reductase assay. **J Antimicrob Chemother.** v. 65 p. 704–712, 2010.

WADE, M. M. & ZHANG, Y. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. **J Antimicrob Chemother.** v. 58 p. 936–941, 2006.

WANG, D.; et al. Prevalence of multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis in Beijing, China: a hospital-based retrospective study. **Jpn J Infect Dis.** v. 63 p. 368-371, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Report 2009: Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing**, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: WHO report 2011.** Geneva: World Health Organization; 2011.

ZHANG, Y.; ZHANG, H.; SUN, Z. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to weak acids. **J Antimicrob Chemother.** v. 52 p. 56–60, 2003.

FIGURAS

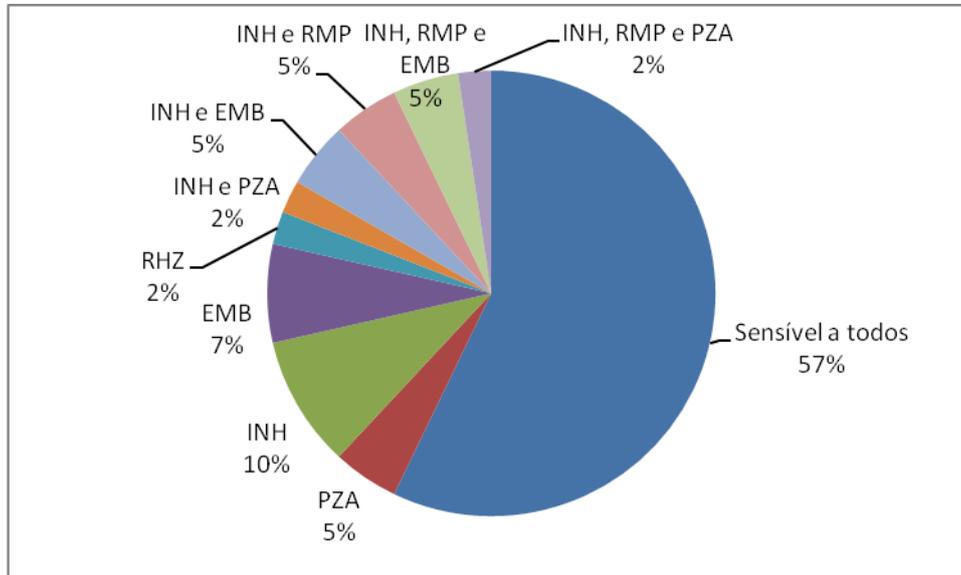


Figura 1 – Porcentagem de cepas resistentes pelo método das proporções. Rifampicina (RMP), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB)

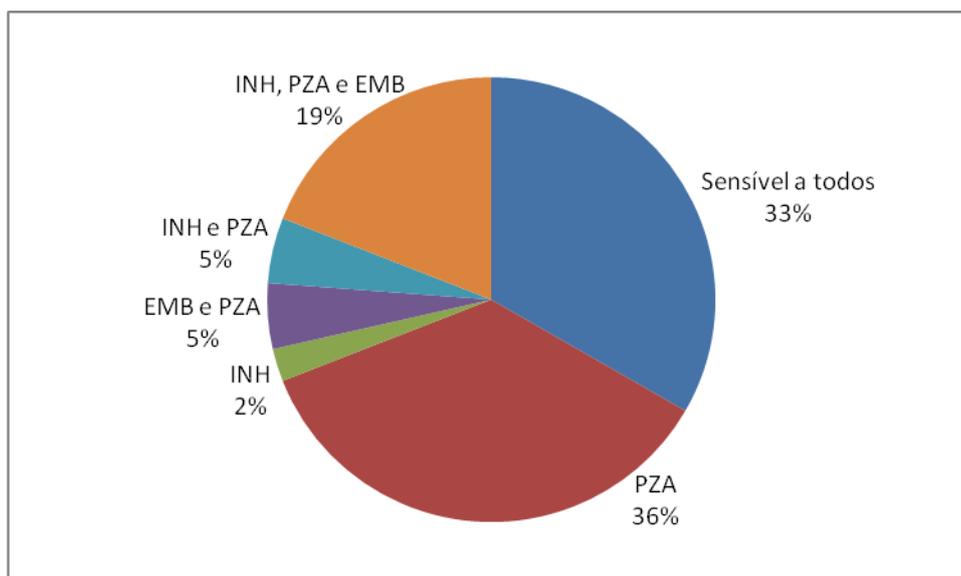


Figura 2 – Porcentagem de cepas resistentes pelo método de microdiluição em caldo. Isoniazida (INH), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB)

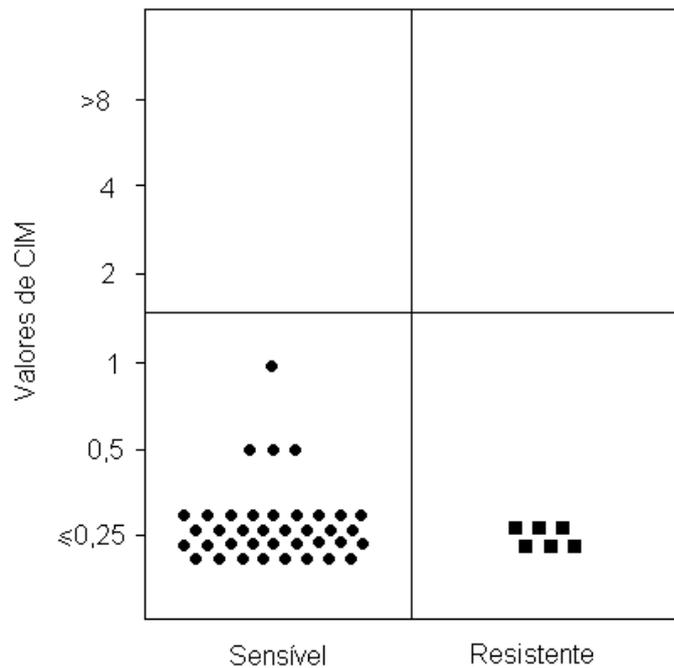


Figura 3 - Correlação entre as CIMs ($\mu\text{g/mL}$) encontradas no método de microdiluição em caldo e método das proporções classificados para a rifampicina. ● isolados que apresentaram concordância entre os métodos. ■ isolados que apresentaram discordância entre os métodos. As linhas verticais separam os isolados entre sensíveis e resistentes no método das proporções. As linhas horizontais separam os isolados entre sensíveis e resistentes no método de microdiluição em caldo.

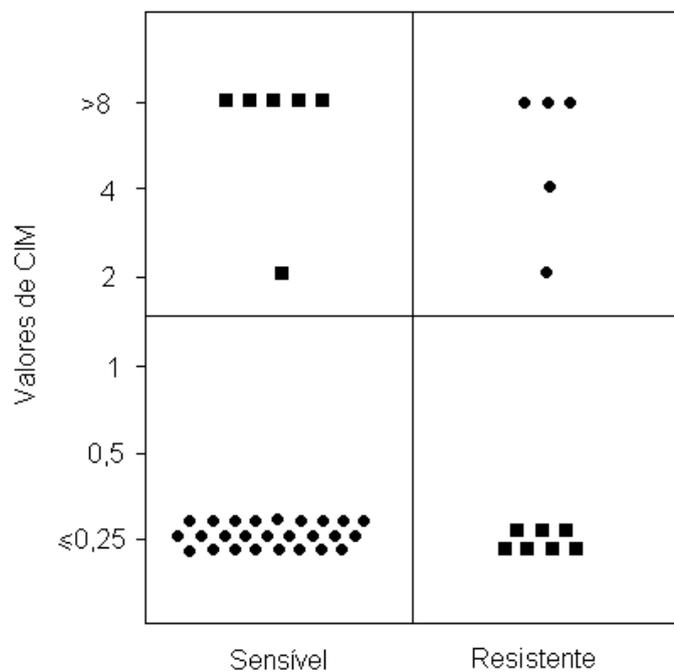


Figura 4 - Correlação entre as CIMs ($\mu\text{g/mL}$) encontradas no método de microdiluição em caldo e método das proporções classificados para a isoniazida. ● isolados que apresentaram concordância entre os métodos. ■ isolados que apresentaram discordância entre os métodos. As linhas verticais separam os isolados entre sensíveis e resistentes no método das proporções. As linhas horizontais separam os isolados entre sensíveis e resistentes no método de microdiluição em caldo.

TABELAS

Tabela 1 – Comparação dos métodos das proporções e de microdiluição em caldo na avaliação da suscetibilidade de resultados de *M. tuberculosis* isolados no HUSM.

Drogas	Método das proporções		Microdiluição em caldo		Índice Kappa
	Suscetibilidade das cepas	Cepas	Cepas resistentes	Cepas sensíveis	
		n	n	n	
Rifampicina	Resistente	6	0	6	0,860465
	Sensível	37	0	37	Ótimo
Isoniazida	Resistente	12	5	7	1,00433
	Sensível	31	6	25	Perfeito
Etambutol	Resistente	7	3	4	1,005941
	Sensível	36	8	28	Perfeito
Pirazinamida	Resistente	4	4	0	1,015089
	Sensível	39	23	16	Perfeito

DISCUSSÃO

A avaliação do perfil epidemiológico de resistência a fármacos dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* no HUSM tornou-se difícil, pois os pacientes até são diagnosticados neste hospital, mas são encaminhados para fazer o acompanhamento na Secretaria de Saúde do município de Santa Maria-RS ou em suas cidades de origem. Todos os casos de resistência relatados neste trabalho foram relativos ao primeiro tratamento e não tivemos acesso ao desfecho de cada paciente para avaliar uma resistência após o tratamento. Mesmo assim a incidência de resistência é preocupante, mesmo porque ocorreram casos de resistência a dois ou três fármacos concomitantemente.

A maioria dos pacientes que foram tratados para a tuberculose foram tratados com o regime padrão de quatro fármacos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) na fase intensiva do tratamento e rifampicina e isoniazida na fase de manutenção. Porém, como eles receberam estes medicamentos na Secretaria de Saúde do município de Santa Maria-RS ou nas suas cidades de origem não podemos afirmar que estes medicamentos estavam na forma da DFC.

Apesar da tuberculose ser uma doença importante e de elevada incidência se comparada com outras doenças que levam a morte se não tratadas corretamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011) e o HUSM atender pessoas de toda a região, o número de pacientes portadores de TB diagnosticados no ano de 2010 foi pequeno. Através dos prontuários classificamos os pacientes quanto a idade, sexo, tabagismo, comorbidades, fase do tratamento e tuberculose pulmonar ou outra. (Anexo D). Porém devido aos fatores citados acima o “n” de nossa pesquisa tornou-se muito pequeno para correlacionar dados epidemiológicos publicáveis, serão necessários estudos de mais alguns anos para que possamos avaliar epidemiologicamente a TB no HUSM.

Como nossos pacientes foram infectados com cepas resistentes aos medicamentos antes de qualquer tratamento, podemos afirmar que todos os pacientes portadores de bacilos resistentes possuíam resistência primária (CHIANG et al., 2010). Com os dados coletados podemos observar que a maioria dos óbitos ocorridos foi decorrente de outras comorbidades.

O primeiro manuscrito apresentado nesta dissertação foi elaborado através dos dados de classificação utilizados para separar a real amostra do objetivo desta. Como já havíamos realizado classificações semelhantes com amostra dos anos de 2008 e 2009 com o objetivo de

formar a micobacterioteca do laboratório de Micobacteriologia do Departamento de Análises clínicas e Toxicológicas da UFSM, agrupamos todos os resultados em um manuscrito.

O primeiro manuscrito apresentado nesta dissertação foi elaborado para alertar os profissionais da área da saúde de nosso município acerca da prevalência de isolados clínicos pertencentes ao grupo das MNT. A maioria das espécies pertencentes ao grupo das MNT são intrinsecamente resistente a vários fármacos, inclusive a alguns dos fármacos usados no tratamento da TB (BRASIL, 2008). De nada adianta enumerar os benefícios da DFC estabelecida pelo Ministério da Saúde se os fármacos que a compõem não possuem efeitos contra o agente causador da enfermidade apresentada pelo paciente. Além disso, pacientes portadores de micobacterioses normalmente possuem alguma outra comorbidade importante e seu tratamento deve ser avaliado com cautela, já que podem ocorrer interações medicamentosas importantes (CHIDEYA et al., 2009; CHIANG et al., 2010).

O manuscrito II, que ainda está em processo de revisão, trata do objetivo geral desta dissertação que consiste em verificar o perfil de suscetibilidade a agentes tuberculostáticos de *M. tuberculosis* isolados no Hospital Universitário de Santa Maria no ano de 2010. Neste trabalho foi utilizado o MMC, um método ainda não recomendado pelo MS para uso na rotina por ainda estar em fase de pesquisa. Apesar disso este método enquadra-se entre um dos métodos de suscetibilidade promissor e que estão sendo amplamente utilizados nos laboratórios de pesquisa.

A identificação de cepas resistentes a fármacos é especialmente importante em áreas com resistência conhecida contra fármacos anti-TB. A importância de se testar novas metodologias fenotípicas para detectar susceptibilidade aos fármacos anti-TB, que sejam práticas e efetivas e que permitam um resultado mais rápido do que o fornecido pelo método convencional, reflete a preocupação com o controle da emergência e da transmissão de cepas resistentes (RIBEIRO et al., 2004). Em 2010 a prevalência média de MDR-TB em novos casos de TB foi de 0,9% no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Infelizmente, áreas com resistência a fármacos geralmente são áreas com recursos limitados em seu sistema de saúde. Assim, testes de suscetibilidade a fármacos rápidos, de sensibilidade confiáveis e de baixo custo são necessários (SYRE et al., 2010).

A utilização de métodos que utilizam placas de microtitulação e meios líquidos tem a vantagem de possuir menor custo, resultados rápidos e quantitativos, além de serem práticas, efetivas e permitirem um resultado mais rápido do que o fornecido pelo método convencional (como o MP) (RIBEIRO et al., 2004). A desvantagem é a produção de aerossol, tornando-se

necessário o uso de cabines de segurança biológica prontamente disponíveis em alguns países em desenvolvimento (SANCHOTENE et al., 2008).

Além disso, testes de suscetibilidade são fundamentais na gestão de pacientes com MDR-TB, pois se estes pacientes não forem detectados serão infecciosos por mais tempo, levando a uma nova oportunidade para a transmissão da doença. Os métodos convencionais de susceptibilidade a fármacos possuem um tempo de resposta demorado que vai de semanas a meses o que dificulta a tomada decisão rápida pelos clínicos quanto ao tratamento (ALBERT et al., 2007). Os métodos moleculares são bem mais rápidos, mas ainda possuem elevados custos, além disso, ainda não foram definidos todos os genes responsáveis por conferir resistência aos principais antimicrobianos. Provavelmente isto ocorra, pois podem ocorrer diversos mecanismos de resistência a um mesmo antimicrobiano (CAMPBELL et al., 2011).

Apesar das limitações na correlação entre o MMC e o MP, considerado padrão ouro, expostas na discussão do manuscrito conseguimos detectar através do MMC isolados clínicos de *M.tuberculosis* resistentes a um dois e até tres fármacos utilizados no tratamento de primeira linha da tuberculose. Através deste mesmo método verificamos também que estes isolados resistentes quando expostos aos quatro fármacos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) associados não mais apresentaram resistencia. Este fato vem ao encontro do conceito da DFC o qual pretende unir os quatro medicamentos anti-TB para combater a resistência dos bacilos. Como já foram realizados estudos que mostram a bioequivalência entre os fármacos da DFC (AGRAWAL et al., 2002) acreditamos que as mudanças no tratamento da tuberculose pelo PNCT/MS servirão para combater as cepas de *M. tuberculosis* resistentes a primeira linha de medicamentos utilizadas contra a TB.

Segundo Blomberg e Fourie (2003) ao impedir a monoterapia e facilitar a ingestão de doses adequadas dos fármacos anti-TB, espera -se que estas ajudem a prevenir o aparecimento de resistência às drogas. Com nosso estudo podemos afirmar que com a DFC é possível combater as cepas resistentes não permitindo assim que mais bacilos mutantes emergem em uma monoterapia.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- Houve uma grande prevalência de MNT entre os isolados clínicos de *M. tuberculosis* no ano de 2010;
- A identificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos isolados de *M. tuberculosis* mostrou-se eficaz e de fácil realização;
- O método de microdiluição em caldo mostrou-se um método bem correlacionado como o método das proporções, de fácil e rápida execução e garantiu a identificação de vários isolados resistentes a um, dois ou três fármacos;
- Todos os isolados clínicos, mesmos os considerados resistentes aos fármacos testados separadamente, foram sensíveis quando testados frente aos fármacos da dose fixa combinada associados. Mostrando a importância deste tratamento no combate aos bacilos resistentes.

REFERÊNCIAS

ABER, V. R.; et al. Quality control in tuberculosis bacteriology. Laboratory studies on isolated positive cultures and the efficiency of direct smear examination. **Tubercle**. v. 61 p. 123–133, 1980.

ALBERT, H.; et al. Evaluation of a rapid screening test for rifampicin resistance in re-treatment tuberculosis patients in the Eastern Cape . **S Afr Med J.**; v. 97 p. 858-863, 2007.

AGRAWAL, S.; et al. Assessment of bioequivalence of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 233 p. 169–177, 2002.

BILLINGER, M.E.; et al. Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005. **Emerg Inf Dis.**; v. 15 n. 10 p. 1562-1569, 2009.

BLOMBERG, B. & FOURIE, B. Fixed-Dose Combination Drugs for Tuberculosis Application in Standardised Treatment Regimens. **Drugs**. v. 63 n. 6 p. 535-553, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe técnico de tuberculose**, julho 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de referencia Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. 1. ed. Brasília, 2008. 436 p. : il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 978-85-334-1447-1

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**. Brasília; 2009[citado 2009 dez 10]. Disponível BRASIL, Ministério em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**, 2010.

BRASIL. Ministerio da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de referencia Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5. ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

BRASIL. Secretaria Estadual da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Micobacterioses. **Recomendações para o diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo; 2005.

BROWN-ELLIOTT, B.A.; WALLACE, R.J. Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clin Microbiol Rev.** v. 15 p. 716-46, 2002.

CAMINERO L. J. A. **Guía de la tuberculosis para Médicos Especialistas**. Paris: Union Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias; 2003.

CAMPBELL, P. J.; et al. Molecular Detection of Mutations Associated with First- and Second-Line Drug Resistance Compared with Conventional Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 55 N. 5 p. 2032–2041, 2011.

CANETTI, G; et al. Advancer in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. **Bull World Healter Organ.** v. 41 p. 31-43, 1969.

CHIANG, C. Y.; CENTIS, R.; MIGLIORI, G. B. Drug-resistant tuberculosis: Past, present, future. **Respirology.** v. 15 p. 413–432, 2010.

CHIDEIA, S.; et al. Isoniazid, Rifampin, Ethambutol, and Pyrazinamide Pharmacokinetics and Treatment Outcomes among a Predominantly HIV-Infected Cohort of Adults with Tuberculosis from Botswana. **Clinical Infectious Diseases.** v. 48 p. 1685–1694, 2009.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature.** v. 393 p. 537-544, 1998.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. **Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice**. Butter Worth-Heinemann, Oxford, 2 ed. 139 p, 1997.

CONNOLLY, L. E.; EDELSTEIN, P. H.; RAMAKRISHNAN, L. Why Is Long-Term Therapy Required to Cure Tuberculosis? **Plos med** v. 4 n. 3 p. 432-445, 2007.

DIVISÃO DE TUBERCULOSE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil Mudanças no tratamento da tuberculose Informes Técnicos Institucionais **Rev Saúde Pública**. v. 44 n. 1 p. 197-199, 2010.

EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm> Acesso em 03 mar 2012.

FAIR, E.; HOPEWELL, P. C.; PAI, M. International standards for tuberculosis care; revisiting the cornerstone of tuberculosis care and control. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 5 p. 61-65, 2007.

FARIA, J. L.; et al. **Patologia Geral: Fundamentos das Doenças, com aplicações clínicas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4^a ed. p. 122-125, 2003.

FERREIRA, R.M.; et al. Non-tuberculous mycobacteria I: one year clinical isolates identification in Tertiary Hospital Aids Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in pre highly active antiretroviral therapy era. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97 n. 5 p. 725-9, 2002.

FRANZBLAU, S.G.; et al. Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36 n. 2 p.362-366, 1998.

GRIFFITH DE, AKSAMIT T, BROWN-ELLIOTT B.A. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 175 n. 4 p. 367-416, 2007.

GRIFFITH, D. E. & TIMOTHY, R. Therapy of refractory nontuberculous mycobacterial lung disease. **Aksamitb Curr Opin Infect Dis**. v. 25 p. 218–227, 2012.

GRUPO DE TRABALHO DAS DIRETRIZES PARA TUBERCULOSE DA SBPT. III **Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia Comissão de Tuberculose da SBPT**. J Bras Pneumol. v. 35 n. 10 p. 1018-1048, 2009.

HALL, R. G.; LEFF, R. D.; GUMBO, T. Treatment of Active Pulmonary Tuberculosis in Adults: Current Standards and Recent Advances: Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **Pharmacotherapy**. v. 29 n. 12 p. 1468-1481, 2009.

HOBBY, G. L.; et al. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 4 p. 94–104, 1973.

HOPEWELL, P. C. et al. International standards for tuberculosis care. **Lancet Infect. Dis.** v. 6 p. 710–725, 2006.

JÖNSSON, S.; et al. Population Pharmacokinetics of Ethambutol in South African Tuberculosis Patients. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 55 n. 9 p. 4230-4237, 2011.

JUNEYOUNG, L.; et al. Antibacterial and Synergistic Activity of Isocryptomerin Isolated from *Selaginella tamariscana*. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 19 n. 2 p. 204–207, 2009.

KUMAR, M.; et al. Rapid inexpensive MIC determination of Mycobacterium tuberculosis isolates by using microplate nitrate reductase assay. **Diag Microbiol and Infect Dis.** v. 53 p. 121-124, 2005.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. **Patologia Básica** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª ed. p. 340-344, 1994.

LAI, C. C.; et al. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008. **Emerg Inf Dis.** v. 16 n. 2 p. 294-296, 2010.

LOPES, A. C. **Tratado de Clínica Médica.** 2.ed. São Paulo: Editora Roca, 2000.

MARTIN, A.; et al. Multicenter study of MTT and resasurin assay for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 9 n. 8 p. 901-906, 2005.

MITNICK, C. D.; et al. Tuberculosis pharmacotherapy: strategies to optimize patient care. **Expert Opin Pharmacother.** v.10 n. 3 p. 381-401, 2009.

MOORE, J.E.; et al. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. **BMC Public Health.** v. 10 p. 612-621, 2010.

MOULDING, T. M. D.; et al. Fixed-Dose Combinations of Antituberculous Medications to Prevent Drug Resistance. **Ann Intern Med.** v. 122 p. 951-954, 1995.

MSHANA, R. N.; et al. Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for Rappid Detection of Rifanpin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** v. 30 n. 5 p. 1214-1219, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE -**Tratamento da Tuberculose – linhas orientadoras para programas nacionais** – OMS, Lisboa 2006.

PAI, M.; KALANTRI, S.; DHEDA, K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis. Part II. Active tuberculosis and drug resistance. **Expert Rev. Mol. Diagn.** v. 6 p. 423-432, 2006.

PETERSON, E. M; et al. Comparison of direct and concentrated acid fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium* spp. **J. Clin. Microbiol.** v. 37 p. 3564–3568, 1999.

RIBEIRO, M. O.; et al. Evaluation of rapid microplate assays using cellular-viability indicators to determine patterns of susceptibility to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* strains. **J Bras Pneumol.**v. 30 n. 4 p. 455-460, 2004.

ROSSETTI, M. L. R.; et al. Resistant tuberculosis: a molecular review. **Rev Saúde Pública.** v. 36 n. 4 p. 525-532, 2002

RUNYON, E. H.; SELIN, M. J.; HARRIS, H. W. Distinguishing mycobacteria by the niacin test. **Amer Rev Tuberc.** v. 79, p. 663, 1959.

SANCHOTENE, K. O.; et al. Comparative evaluation of the nitrate reductase assay and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first line anti-tuberculosis drugs. **Brazilian Journal of Microbiology.** v. 39 p. 16-20, 2008.

SATYANARAYANA, G.; et al. Mycobacterial infections in a large Virginia hospital, 2001-2009. **BMC Infectious Diseases.**; v. 11 p. 113-120, 2011.

SENNA, S. G.; et al. Identificação e análise de MNTs causadoras de infecção no Hospital Universitário - HUCFF/UFRJ no Rio de Janeiro. **J Bras Pneumol.**; v. 32 n. 3 p. 135-158, 2006.

SONG, S; et al Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. **J Microbiol Method.** v. 77 p. 165–177, 2009.

SYRE, H.; OVREA, K.; GREWAL, H. M. S. Determination of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide in liquid and solid media assessed by a colorimetric nitrate reductase assay. **J Antimicrob Chemother.** v. 65 p. 704–712, 2010.

TARANTINO, A. B. **Doenças Pulmonares** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª ed. p. 294-380, 2002.

TUBERCULOSIS. Disponível em: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>, acesso em: 30 mai. 2011.

VIADER-SALVADÓ, M. J.; MOLINA-TORRES, C. A.; GUERRERO-OLAZARÁN, M. Detection and identification of mycobacteria by mycolic acid analysis of sputum specimens and young cultures. **J. Microbiol Meth.** v.70 p. 479–483, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Report 2009: Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing**, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: WHO report 2011.** Geneva: World Health Organization; 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Toman's Tuberculosis case detection, treatment and monitoring: questions and answers.** Geneva: World Health Organization; 2004.

ZHANG, Y.; ZHANG, H.; SUN, Z. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to weak acids. **J Antimicrob Chemother.** v. 52 p. 56–60, 2003.

APÊNDICE A – Tabela de resultados comparativos entre os métodos utilizados.

	INH (CIMs em µg/mL)	INH MP (0,2 µg/mL)	RMP (CIMs em µg/mL)	RMP MP (40 µg/mL)	EMB (CIMs em µg/mL)	EMB MP (2 µg/mL)	PZA (CIMs em µg/mL)	PZA MP (100 µg/mL))	4 em 1 (CIMs em µg/mL)
H37Rv	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S ≤25	S	S ≤0,25/4/25
878/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	R	S 100	S	S ≤0,25/4/25
378/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S 100	S	S ≤0,25/4/25
849/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	R 400	R	S ≤0,25/4/25
958/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S ≤25	S	S ≤0,25/4/25
980/10	R 2	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S ≤25	S	S ≤0,25/4/2
387/10	R >8	R	S ≤0,25	R	R >128	R	R >800	S	S ≤0,25/4/25
065/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	R 200	S	S ≤0,25/4/25
318/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	R 400	S	S ≤0,25/4/25
946/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S 100	S	S ≤0,25/4/25
050/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S 100	S	S ≤0,25/4/25
310/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S 16	S	R 200	S	S ≤0,25/4/25
840/10	S ≤0,25	R	S ≤0,25	R	S ≤4	S	R 200	R	S ≤0,25/4/25
035/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S 16	S	R 200	R	S 0,5/8/50
461/10	S ≤0,25	R	S ≤0,25	S	S 16	S	R 200	S	S ≤0,25/4/25
292/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	R 64	S	R 200	S	S ≤0,25/4/25
480/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S 100	S	S ≤0,25/4/25
018/10	R >8	S	S ≤0,25	S	R >128	R	R >800	S	S 1/16/100
217/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	R 200	S	S ≤0,25/4/25
811/10	S ≤0,25	R	S ≤0,25	S	S ≤4	S	R 400	S	S ≤0,25/4/25
002A/10	S ≤0,25	R	S ≤0,25	R	S ≤4	R	S 100	S	S ≤0,25/4/25
903/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S ≤25	S	S ≤0,25/4/25
979/10	R >8	S	S ≤0,25	S	R >128	S	R >800	S	S ≤0,25/4/25
014/10	R >8	R	S ≤0,25	S	R >128	S	R >800	S	S ≤0,25/4/25
172/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S 50	S	S ≤0,25/4/25
654/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	R 200	S	S ≤0,25/4/25
462/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S 100	S	S ≤0,25/4/25
379/10	R 2	R	S 1	S	S ≤4	S	R >800	R	S ≤0,25/4/25
345/10	R 4	R	S ≤0,25	S	S ≤4	R	R 400	S	S ≤0,25/4/25
802/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	R	R 200	S	S ≤0,25/4/25
578/10	R >8	R	S ≤0,25	S	R >128	R	R >800	S	S ≤0,25/4/25
406/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	R	S ≤4	S	R 400	S	S ≤0,25/4/25
232/10	R >8	S	S 0,5	S	R >128	S	R >800	S	S ≤0,25/4/25
409/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S 50	S	S ≤0,25/4/25
159/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	R 200	S	S ≤0,25/4/25
223/10	R >8	S	S 0,5	S	R >128	S	R >800	S	S 05/8/50
031/10	R >8	S	S 0,5	S	R >128	S	R >800	S	S 05/8/50
366/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	R 200	S	S ≤0,25/4/25
415/10	S ≤0,25	R	S ≤0,25	R	R 32	S	R >800	S	S ≤0,25/4/25
582/10	S ≤0,25	R	S ≤0,25	S	R >128	S	R 400	S	S ≤0,25/4/25
142/10	S ≤0,25	R	S ≤0,25	R	S ≤4	S	S 100	S	S ≤0,25/4/25
293/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S ≤25	S	S ≤0,25/4/25
076/10	S ≤0,25	S	S ≤0,25	S	S ≤4	S	S ≤25	S	S ≤0,25/4/25

APÊNDICE B – Tabela de resultados da classificação epidemiológica.

ANEXO A – Comprovante de submissão do manuscrito I para publicação no Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial.

ANEXO B – Carta de aprovação Comitê de Ética em pesquisa - UFSM