

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**Realização do método GASMoC em *Mycobacterium*
bovis (BCG) em amostras microbiológicas**

Rosana Lopes Moreno

Doutora Ana Lúcia Ramos, ESTeSL

Mestrados em Tecnologias Moleculares em Saúde

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2021

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Realização do método GASMoC em *Mycobacterium bovis* (BCG) em amostras microbiológicas

Rosana Lopes Moreno

Orientadora: Doutora Ana Lúcia Ramos, ESTeSL

Júri

Presidente: Doutor Rui Miguel Brito

Arguente: Doutora Isabel Maria Paes Faria

Arguente: Doutora Margarida Pires Simões

Mestrados em Tecnologias Moleculares em Saúde

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2021

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela força e coragem para conseguir realizar o meu objetivo durante essa caminhada.

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a contribuição de diversas pessoas e instituições, a quem desejo deixar expressos os meus agradecimentos. Perante a difícil tarefa de enumerar todas as pessoas, peço desculpa a quem não for referido e espero que não falem oportunidades para lhes expressar a minha gratidão.

À minha Orientadora, Prof. Dr.^a Ana Ramos e minha Co-Orientadora Prof. Dr.^a Edna Ribeiro, pelo apoio e críticas extremamente importantes e enriquecedores durante a árdua tarefa de orientar-me à distância, sobre tema tão promissor e relevante para a saúde pública, na elaboração desta tese.

Um especial agradecimento a Dr.^a Maria Favila Menezes e a Instituição de Germano de Sousa pelo apoio, simpatia e a hospitalidade por permitir a realização deste trabalho nas suas instalações. Aos vários trabalhadores que me receberam com simpatia e curiosidade em dias atarefados.

Ao Professor e amigo António Maximiano, pela supervisão deste trabalho, pela sua disponibilidade sempre que necessitei de ajuda, pela transmissão de conhecimentos de forma clara e esclarecedora, e por todo o incentivo e apoio.

Ao amigo e professor Aires da Moura agradeço a disponibilidade e auxílio prestado.

A toda a minha família, em especial o meu pai e a minha irmã, pois sem o seu carinho, ajuda, compreensão e incentivo nunca teria percorrido o caminho que me permitiu chegar à elaboração desta dissertação.

Ao meu namorado, Jurandy dos Santos, sou grata por ter estado ao meu lado em todos os momentos bons e maus e com amizade e carinho me fez acreditar que valia a pena continuar. Obrigada pelo amor, dedicação e compreensão.

Em especial, as minhas amigas Carla Gonçalves, Rosymere Moreira, Edmilza Corsino, Cleise Rodrigues e Rosana Ortet que sempre me apoiaram desde início, dando incentivo para seguir em frente não importa o tamanho das dificuldades.

RESUMO

Nas infeções causadas pelo gênero *Mycobacterium* identificar a espécie é importante para distinguir entre as cepas e agrupá-las por critérios de interesse para microbiologistas e clínicos, influenciando inclusive no esquema de tratamento a ser aplicado. Segundo a World Health Organization, em 2014 a tuberculose atingiu o mesmo patamar que a infeção por Human Immunodeficiency Virus (HIV) em relação à mortalidade. A técnica de Ziehl-Neelsen (ZNT) é o método de coloração mais utilizado para a deteção dos BAAR bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) e usa uma mistura aquecida de cabol-fucsina, que contém fucsina básica e fenol. Considerando que a fucsina é o componente responsável pela coloração rosada de BAAR, o papel do fenol não é completamente compreendido e foi sugerido que sua exclusão não afeta a capacidade de deteção do ZNT. Uma vez que o fenol é altamente tóxico e induz várias lesões em diversos órgãos quando exposto de forma prolongada, e tendo em conta que já foi observado que o método GASMoC é o método alternativo que não utiliza o fenol e é eficaz a detetar BAAR em secções histológicas, o objetivo deste estudo é determinar a capacidade de deteção de *M. bovis* BCG em amostras microbiológicas (urina) pelo método de GASMoC. Um total de 32 esfregaços, inoculados com *M. bovis* BCG foi analisado no Laboratório Germano de Sousa entre o mês de Fevereiro ao mês de Maio de 2021, recorrendo ao método de GASMoC em paralelo com ZNT, onde foram utilizadas duas diluições (1:10 e 1:100) para ambos os métodos. O método de GASMoC foi otimizado com vários ácidos de diferentes concentrações e com a fucsina básica de diferentes concentrações. Nos 32 esfregaços analisados, 12 testaram positivo (75%) para a ZNT e para duas diluições feitas e 4 testaram negativo em diluições de 1:100, em contrapartida os 16 esfregaços analisados para o método de GASMoC testaram negativos para ambas diluições (1:10 e 1:100). O resultado da positividade foi de 37,5% e 62,5% de negatividade. Na otimização do método GASMoC na amostra de urina os resultados apresentaram algumas alterações dos parâmetros, mas ainda assim não se consegue detetar *M. bovis* BCG. Em conclusão pode-se observar que a ZNT obteve maior sensibilidade em relação ao método GASMoC. A coloração permitiu detetar *M. bovis* BCG mesmo em baixas concentrações em ambas diluições.

Palavras-chave: Tuberculose – *Mycobacterium bovis* BCG – Técnica de Ziehl Neelsen – Método GASMoC

ABSTRAT

In infections caused by the genus *Mycobacterium*, identifying the species is important to distinguish between strains and group them by criteria of interest to microbiologists and clinicians, including influencing the treatment regimen to be applied. According to the World Health Organization, in 2014 tuberculosis reached the same level as Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection in terms of mortality. The Ziehl-Neelsen technique (ZNT) is the most commonly used staining method for the detection of alcohol-acid-fast bacilli (AFB) and uses a heated mixture of carbol-fuchsin, which contains basic fuchsin and phenol. Considering that fuchsin is the component responsible for the pink color of AFB, the role of phenol is not fully understood and it has been suggested that its exclusion does not affect the detection ability of ZNT. Since phenol is highly toxic and induces several lesions in various organs when exposed to prolonged exposure, and taking into account that it has already been observed that GASMoC method is the alternative method that does not use phenol and is effective in detecting BAAR in histological sections, the aim of this study is to determine the ability to detect *M. bovis* BCG in microbiological samples (urine) by the GASMoC method. A total of 32 smears inoculated with *M. bovis* BCG were analyzed at the Germano de Sousa Laboratory from February to May 2021 using the GASMoC method in parallel with ZNT, where two dilutions were used (1: 10 and 1:100) for both methods. The GASMoC method was optimized with various acids of different concentrations and with basic fuchsin of different concentrations. In the 32 smears analyzed, 12 tested positive (75%) for ZNT and for two dilutions made and 4 tested negative in 1:100 dilutions, on the other hand, the 16 smears analyzed for the GASMoC method tested negative for both dilutions (1: 10 and 1:100). The result of positivity was 37.5% and 62.5% of negativity. In the optimization of the GASMoC method in the urine sample, the results showed some changes in the parameters, but still it is not possible to detect *M. bovis* BCG. In conclusion, it can be observed with ZNT staining obtained greater sensitivity in relation to the GASMoC method. The staining allowed the detection of *M. bovis* BCG even at low concentrations in both dilutions.

Keywords: Tuberculosis, Ziehl-Neelsen Tecnique, GASMoC Method, *Mycobacterium bovis* BCG

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	1
2	PERTINÊNCIA	3
3	TUBERCULOSE	5
3.1	Breve historial da tuberculose	5
3.2	Biologia e classificação do bacilo da tuberculose	6
3.3	Epidemiologia da tuberculose.....	9
3.4	Tuberculose pulmonar primária.....	12
3.5	Tuberculose pós primária e reativada.....	12
3.6	Tuberculose extrapulmonar	13
3.7	Tuberculose associada a VIH	13
3.8	Transmissão da tuberculose.....	15
3.9	Sintomas da tuberculose.....	16
3.10	Tratamento de tuberculose	17
3.10.1	Tratamento de tuberculose pulmonar.....	17
3.10.2	Tratamento da tuberculose extrapulmonar.....	20
3.11	Tratamento em situações particulares	21
3.11.1	Na grávida.....	21
3.11.2	Na criança.....	22
3.11.3	No doente com coinfeção pelo VIH.....	22
4	MYCOBACTERIUM BOVIS (BCG)	24
4.1	A cepa BCG	24
4.2	Cepas filhas de BCG.....	24
4.3	A vacina BCG.....	25
4.4	A vacinação BCG.....	26
4.5	Revacinação com BCG	27
4.6	BCG e VIH	28
5	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM TUBERCULOSE	29

5.1	Meios Complementares de Diagnóstico	29
5.2	Radiologia.....	29
5.3	Exame Micobacteriológico Direto.....	30
5.3.1	Técnica de Ziehl-Neelsen.....	31
5.4	Exame Micobacteriológico Cultural	34
5.5	Exames imunoquímicos.....	35
5.6	Exame de biologia Molecular: Testes de amplificação de ácidos nucleicos	35
6	REVISÃO DE LITERATURA	37
6.1	Introdução.....	37
6.2	Desenvolvimento teórico	37
6.2.1	A perspetiva histórica.....	37
6.3	Procedimento para melhorar a sensibilidade do método Ziehl-Neelsen	41
6.3.1	Processamento de amostra.....	41
6.3.2	Concentrações de reagente	43
6.3.3	Modificações na microscopia.....	44
6.3.4	Leitura de esfregaços	45
6.4	Algumas modificações do método Ziehl-Neelsen ao longo do tempo segundo revisão sistemática de literatura de Siqueira <i>et al.</i> (1984), (121):.....	45
7	MATERIAIS E MÉTODOS	48
7.1	Descrição do estudo.....	48
7.2	Local do desenvolvimento do estudo	48
7.3	Materiais e equipamentos utilizados.....	48
7.4	Reagentes utilizados.....	49
7.5	Protocolos utilizados	49
7.5.1	Inoculação da suspensão bacteriana	49
7.5.2	Preparação de esfregaço.....	50
7.5.3	Coloração do esfregaço - Técnica de Ziehl-Neelsen.....	50
7.5.4	Coloração do esfregaço – Método GASMoC.....	50
7.6	Otimização do método GASMoC.....	51
7.7	Análise estatística.....	52
7.8	Considerações éticas	52

8	RESULTADO	53
8.1	Caracterização da amostra.....	53
8.2	Resultados da otimização do método GASMOC.....	57
9	DISCUSSÃO	60
10	LIMITAÇÕES	64
11	CONCLUSÃO	64
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Característica microscópica dos bacilos álcool ácidos resistentes em esfregaço corado pelo método de Ziehl Neelsen	7
Figura 3.2 Países que tiveram pelo menos 100.000 casos incidentes de TB em 2019. ...	11
Figura 3.3 Prevalência do VIH em novos casos de tuberculose (%).	14
Figura 5.1 Baciloscopia de expetoração pela técnica de Ziehl-Neelsen	33
Figura 5.2 Baciloscopia de expetoração pelo método de fluorescência.....	33
Figura 6.1 Bacilos álcool ácido resistente corados com a técnica convencional de Ziehl-Neelsen (a,c) e o método GASMoC (b,d) em amostras de tecido extrapulmonar prévio de tuberculose.	40
Figura 8.1 Bacilos álcool ácido resistentes corados com a técnica convencional de Ziehl-Neelsen (a,b) em amostras de urina com inoculação de <i>M. bovis</i> BCG diluição 1:10 (a), diluição 1:100 (b).....	54
Figura 8.2 Bacilos álcool ácido resistente corados com a técnica convencional de Ziehl-Neelsen (a, c) e o método GASMoC (b, d) em controlos positivos. amostras de tecido extrapulmonar (a, b), suspensão bacteriana (c, d).....	56
Figura 8.3 Deteção de <i>M. bovis</i> BCG pela técnica de Ziehl-Neelsen e método de GASMoC. Frequências absolutas das amostras de urina submetidas á técnica de Ziehl-Neelsen (a) e ao método GASMoC (b) avaliadas como positivas e negativas para BAAR. Um total de 32 esfregaços foram analisados.....	57
Figura 8.4 Bacilos álcool ácido resistentes corados com método GASMoC usando a solução de diferenciação álcool 70% e fucsina básica a 4% (a,b) em amostras de urina com inoculação de <i>M. bovis</i> BCG diluição 1:10 (a), diluição 1:100 (b).	59
Figura 8.5 Bacilos álcool ácido resistentes corados com método GASMoC usando a solução de diferenciação ácido clorídrico 1% (a) e ácido sulfúrico 25% (b) e fucsina básica a 4% em amostras de urina com inoculação de <i>M. bovis</i> BCG diluição 1:10 (a), diluição 1:100 (b).....	59

ÍNDICE DE QUADROS

Quadros 3.1	Classificação das micobactérias.....	8
Quadros 3.2	Classificação da patogenicidade das espécies	9
Quadros 3.3	As formas mais comuns de tuberculose extrapulmonar.....	13
Quadros 3.4	Marcadores clínicos da tuberculose.....	17
Quadros 3.5	Tipos de resistência a antibiótico que existe de TB.....	17
Quadros 3.6	Regime terapêutico preferencial TB/VIH	23

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Classificação dos fármacos e doses recomendadas.	18
Tabela 3.2 - Tratamento da tuberculose extrapulmonar: esquema e duração	20
Tabela 3.3 - Corticoterapia na TB extrapulmonar: indicação, doses e duração do tratamento.....	21
Tabela 6.1 - Sensibilidade da baciloscopia após diversas técnicas de processamento de amostras.	43
Tabela 6.2 - Sensibilidade da baciloscopia com diferentes reagentes de coloração.	44
Tabela 6.3 - Sensibilidade da baciloscopia com diversas variações microscópicas.	45
Tabela 7.1 Diferentes concentrações de Fucsina básica.....	51
Tabela 7.2 Diferentes tipos de diferenciadores (solução álcool-acido).....	51
Tabela 8.1 Resultados da coloração com a técnica de Ziehl-Neelsen e o método GASMoC.....	54
Tabela 8.2 Resultados de diferentes diluições para a técnica de Ziehl-Neelsen e o método GASMoC.....	54
Tabela 8.3 Resultado da coloração com diferentes concentrações de fucsina básica observados no método GASMoC.	58
Tabela 8.4 Resultados da coloração com diferentes soluções álcool-ácidos observados no método GASMoC.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AM Amicacina	MTB <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
AVR Antiretoviral	OMS Organização Mundial de Saúde
BAAR Bacilo álcool-ácido resistente	PCR Polymerase Chain Reaction
BCG Bacilo Calmette Guérin	RIF Mutações de Resistência à Rifampicina
CM Capreomicina	RNTCP Programa Nacional Revisado de Controle da Tuberculose da Índia
CMTB <i>Complexo Mycobacterium tuberculosis</i>	RR-TB Tuberculose Resistente à Rifampicina
DMC Centros de Microscopia Designados	TAAN Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos
GLC/MS Cromatografia gás líquido/espectrometria de massa	TB Tuberculose
ECR Equipas Coordenadoras Regional	TC Tomografia Computadorizada
FQ Fluoroquilona	TNF Fator Necrose Tumoral
IABS Internacional Alliance for Biological Standardization	TST Teste cutâneo Tuberculínico
ILTB Infecção Latente da Tuberculose	TT Teste Tuberculínico
KM Kanamicina	UNICEF Fundo de Emergência das Nações Unidas para a Infância
LCR Líquido Cefalorraquidiano	VIH Vírus da Imunodeficiência Humana
MF Microscopia de Fluorescência	XRD Extremamente Resistentes aos Medicamentos
MNT Micobactérias não tuberculosas	ZNT Técnica de Ziehl-Neelsen
MRD-TB Tuberculose Multirresistentes aos Medicamentos	
MT Micobactérias	

1 INTRODUÇÃO

Pertencente ao único gênero da família *Mycobacteriaceae* é um grupo diversificado de bactérias que diferem amplamente em várias características, como seu potencial patogênico em humanos e animais, reservatórios e dinâmica de crescimento em cultura. Na maioria das vezes, as micobactérias podem ser divididas em quatro grandes grupos com base em diferenças fundamentais na epidemiologia, associação com a doença e capacidade de crescer *in vitro*: aquelas que pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium ulcerans* e aquelas referidas como micobactérias não tuberculosas (NTM) (1).

Os algoritmos para testar amostras para micobactérias são complicados, pois vários testes e vários algoritmos apropriados podem ser usados no laboratório clínico. Em última análise, quaisquer métodos e algoritmos usados devem garantir que o complexo *M. tuberculosis* seja detectado ou descartado o mais rápido possível e que as MNT sejam detectadas e identificadas para ajudar a determinar se são clinicamente significativas. Esta seção fornece um algoritmo de teste para amostras de tuberculose (TB) e discute algumas das opções alternativas, incluindo a decisão de encaminhar os serviços para outro laboratório (2). Qualquer algoritmo para testar amostras de pacientes com suspeita de TB deve incluir um Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos (TAAN) para o complexo *M. tuberculosis*. Idealmente, o TAAN deve ser realizado em todos os pacientes com suspeita de TB pela primeira vez, e os resultados devem ser relatados dentro de 48 h após a receção da amostra (3). A maioria das amostras enviadas ao laboratório que são aceitáveis para cultura bacteriana de rotina também são aceitáveis para processamento de BAAR, no entanto, cada laboratório deve desenvolver critérios específicos para aceitação e rejeição (4) para fornecer métodos para o isolamento ideal de *Mycobacterium spp.* A maioria das amostras será obtida do trato respiratório, especialmente expectoração e escarro induzido (o volume ideal é de 5 a 10 ml), aspirados brônquicos e lavado broncoalveolar (5).

Também são aceitáveis para processamento de BAAR fluidos corporais como urina; líquidos peritoneal, pleural, sinovial e pericárdico; e amostras de biópsia de tecido de pulmão, fígado e rim, etc. Fluidos, tecidos e fluidos de lavagem (gástrico e broncoalveolar)

são muito melhores para a recuperação de BAAR do que as amostras coletadas em swabs (6). O líquido cefalorraquidiano (LCR) é uma amostra aceitável para processamento micobacteriano, desde que seja obtido um volume adequado (5 a 10 ml é preferível), (7).

O aumento das infeções por micobactérias levou ao desenvolvimento de formas mais rápidas e eficientes de deteção e caracterização de micobactérias no laboratório de microbiologia clínica. Os objetivos do laboratório de micobacteriologia diagnóstica que devem ser atendidas à medida que entramos na década de 1990 incluem (1) relatório de esfregaço para o médico em 24 horas; (2) deteção de BAAR em 14 dias; (3) identificação ao nível de espécie dentro de 17 a 21 dias; e (4) disponibilidade dos resultados do teste de suscetibilidade antimicrobiana em 28 dias (8,9).

A microscopia é o teste laboratorial mais utilizado por ser de baixo custo em todo o mundo, só é positivo se a concentração dos bacilos ácido resistente de *M. tuberculosis* excedem 10.000 bacilos por ml de expetoração (10). Técnica de cultura de tuberculose geralmente é considerado com maior sensibilidade do que a microscopia, e a sensibilidade da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é intermédia entre a cultura e microscopia (11). Dos 5,2 milhões de pacientes com tuberculose pulmonar notificados à OMS em 2014, somente 58% dos casos foram confirmados por métodos laboratoriais, como esfregaço ou cultura (12). Os 42% restantes dos pacientes foram diagnosticados apenas com critérios clínicos (história dos sintomas ou radiografia de tórax), enfatizando que em ambientes com recursos limitados há necessidade de maior disponibilidade de diagnósticos.

Os métodos de diagnóstico atualmente em uso ou em desenvolvimento que podem ajudar a atingir esses objetivos incluem métodos mais sensíveis de deteção direta e menos e dispendioso, técnicas aprimoradas para cultura, identificação e testes de suscetibilidade, e o uso de sondas de ácido nucleico para deteção, identificação e tipagem epidemiológica (13).

2 PERTINÊNCIA

Apesar dos grandes avanços no diagnóstico de infecções por micobactérias, o exame para BAAR continua sendo uma ferramenta primária isso porque identifica BAAR altamente infeciosos em casos de baciloscopia positiva, é rápido e barato, a sua facilidade de preparação e disponibilidade torná-lo particularmente atraente na maioria dos cenários globais. Embora tenha sido relatado que tem mais de 80% sensibilidade comparada com a cultura para identificar casos de TB pulmonar em algumas configurações, a sensibilidade também foi relatada como sendo menor e variável em outras configurações (14). A microscopia de esfregaço de BAAR é de utilidade limitada para estudos paucibacilares da doença como em pacientes pediátricos, pessoas vivendo com HIV e aqueles com infecções extrapulmonares (1).

Os últimos anos trouxeram importantes alterações no diagnóstico de tuberculose no laboratório clínico. Detecção direta de compostos micobacterianos por métodos químicos altamente sofisticados, como cromatografia gás-líquido/espectrometria de massa (GLC/MS), (15) ou detecção direta de BAAR em amostras clínicas por métodos biológicos visam essencialmente com o mesmo objetivo: aumentar a sensibilidade e especificidade da abordagem diagnóstica, por um lado, e reduzindo o tempo de resposta do outro (16,17).

A escolha do tema contextualiza-se na área da Microbiologia Clínica fornece-nos as bases para a pesquisa laboratorial para detecção da *M. bovis* BCG, usando uma técnica de esfregaço corada pelo método de GASMoC que elimina o uso de fenol e usa fucsina básica aquosa a 37 ° C para a coloração de BAAR.

Com o objetivo de aumentar a contribuição com a comunidade científica, especialmente na área de Microbiologia Clínica, o trabalho proposto nesta dissertação tem por escopo testar a eficiência do método GASMoC em amostras microbiológicas (urina) para *M. bovis* BCG, pois a técnica pode contribuir no desenvolvimento de melhores modelos e ferramentas de diagnóstico que possa promover o bem estar dos animais e do ambiente com maior possibilidade de previsão de eficácia e segurança.

Objetivo geral:

- Determinar a capacidade de deteção de micobactérias pelo método GASMoC em amostra de microbiológica de urina.

Objetivo específico:

- Determinar a capacidade de deteção *M. bovis* BCG pelo método GASMoC em amostra de urina.
- Testar sensibilidade do método GASMoC na deteção de *M. bovis* BCG em diferentes concentrações de urina.
- Comparar a sensibilidade entre a técnica de Ziehl-Neelsen e o método GASMoC.
- Revisão de literatura em relação ao método de coloração bacilar.

Este estudo foi realizado de Fevereiro a Maio de 2021, onde foram realizadas as análises microbiológicas da amostra de urina usada diretamente para microscopia de esfregaço com ZNT e o método GASMoC em simultâneo. Durante esse período, foram realizados quatro ensaios/experiências e uma experiência de otimização do método de GASMoC, onde para cada ensaio foram avaliados 8 esfregaços com diluição 1:10 e 1:100 para ZNT e 8 esfregaços com as mesmas diluições para o método GASMoC, um total de 32 esfregaços e 2 esfregaços controlo positivo para *M. bovis* (BCG). E para otimização do método GASMoC foram analisados 144 esfregaços com diluições 1:10 e 1:100, foram analisados diferentes ácidos com concentrações diferentes e diferentes concentrações de fucsina básica e 6 controlos foram utilizados 3 esfregaços de tecido de Zebrafish - *M. marinum* e 3 esfregaços se suspensão de 3.7 de McFarland – *M. bovis* BCG.

3 TUBERCULOSE

3.1 BREVE HISTORIAL DA TUBERCULOSE

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa que acomete a humanidade há milhões de anos. Estudos fósseis demonstraram a presença de lesões ósseas em esqueletos de há cinco mil anos A.C. (18). As primeiras descrições anátomo-patológicas da doença aparecem documentadas em 1679 por Delaboé Silvius, contudo não se conhecia a sua causa nem se mencionava a possibilidade sobre a sua ser origem infecciosa (19). No início do século XIV, Bayle fez a demonstração tuberculosa, sustentado que o tubérculo e nódulo miliar são específicos da tuberculose, sendo confirmadas pela observações históricas de Laennee (1819) estabelecendo a especificidade e a unidade das várias lesões que surgem no pulmão, elucidando que suas diferenças são referentes a fase evolutiva da doença (19,20).

Apesar do conhecimento da tuberculose antes da época de Hipócrates (460 A.C), a primeira demonstração de que a doença era de origem contagiosa, foi feita em 1865 por Jean-Antoine Villemin, através duma experiência feita com coelhos e pacientes tuberculosos, descobriu que ao injetar fluidos de pacientes tuberculosos nos coelhos, estes desenvolviam tuberculose. Essa experiência só veio a ser confirmada em 1882 por Robert Koch, que isolou e caracterizou o agente etiológico da tuberculose como uma bactéria em forma de bastão chamada bacilo de tubérculo, revolucionando assim a ciência médica (19). Em 1944 Schatz, Bugie e Waksman descobriram estreptomicina, sendo importante marco para início da quimioterapia. Depois com a descoberta do PAS (ácido paraminossalicílico) em 1946 e da hidrazida em 1952, passou-se a dispor de arsenal terapêutico medicamentoso suficiente (21).

Pressupõe-se que a tuberculose atingiu primeiro os animais pela variante *M. bovis*, e depois os humanos. A infecção humana provavelmente ocorreu através da ingestão da carne e leite contaminados ou por via aérea. Finalmente os bacilos de localização principalmente pulmonar e transmissão aérea firmaram-se como patógeno da espécie humana (19). A tuberculose era denominada, escrófula, consumação, moléstia disseminadora e “peste branca” principalmente por ter alcançado proporções epidémicas

durante a revolução industrial, e por causar morte de mil milhões de pessoas nos últimos 200 anos (20).

3.2 BIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DO BACILO DA TUBERCULOSE

O género *Mycobacterium* (do grego *Mycos*: fungos) abrange parasitas obrigatórios, saprófitas e formas intermediárias. Contém mais de 50 espécies, entre os quais pelo menos 22 causam doenças no homem salientando as seguintes espécies: *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium* e *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium leprae* (22). As bactérias pertencentes ao género *Mycobacterium*, o único representante da família *Mycobacteriaceae*, são bacilos curvos ou rectos, imóveis de 0,2 a 0,7µm de largura e 1 a 3 µm de comprimento. São organismos aeróbios, não esporulados e de crescimento lento ou seja, requerem mais de sete dias para produzir colónias visíveis em meios de cultura sólidos, pois a natureza hidrofóbica da sua superfície celular leva a formação de aglomerados e alterações na propriedade dos nutrientes através da célula (23).

Devido ao seu alto conteúdo lipídico na parede celular (cerca de 60% do seu peso seco), possuem muitas características como a propriedade álcool-ácido resistência, crescimento lento, resistência a detergentes, resistência aos antibióticos antimicrobianos mais utilizados, antigenicidade, formação de agregados (24). A sua parede celular contém uma membrana plasmática interna espessa de peptidoglicano e uma membrana externa delgada. Ainda contém na sua membrana plasmática proteínas, monóxido de fosfatidinositol e lipoarabinomanano (LAN), ácidos gordos de cadeia longa (75 a 90 carbonos) denominado ácido micólico (25). Não se coram bem pelo método de Gram devido a uma camada incomum de ácidos micólicos em sua parede celular o que torna impermeável a coloração de gram, mas são considerados Gram positivos (26).

Com isso vários corantes básicos podem o corar, mas não se descoram com a solução de álcool ácido. Isto ocorre devido presença de ácidos micólicos, que são lipídios que compõe a parede celular das micobactérias, que vai impedir a remoção do corante pelo álcool-ácido por isso são caracterizados como BAAR, permitindo sua identificação

por microscopia direta (27) (Figura 3.1). Uma outra característica é o aspeto morfológico das colónias, que pode ser usado como “screening” na identificação das espécies cultivadas. Elas podem ter vários aspetos tais como, colónias secas e rugosas, lisa-opaca e lisa-transparente.

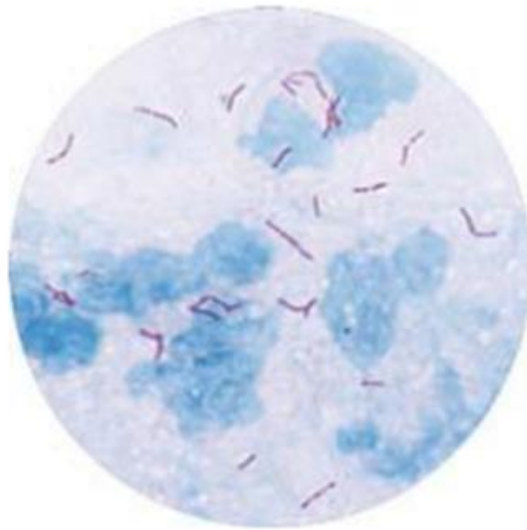


Figura 3.1 Característica microscópica dos bacilos álcool ácidos resistentes em esfregaço corado pelo método de Ziehl Neelsen

Fonte: (28)

No final do século XIX foi descrito pela primeira vez (logo após a descrição seminal de Robert Koch de *M. tuberculosis* como agente causador da tuberculose em 1882), décadas se passaram antes que a infecção humana por MNT (Micobactérias Não Tuberculosa) fosse identificada (29). Desde então, mais de 90 espécies foram identificadas a partir de amostras humanas, tendo várias outras ainda não classificadas ou não identificadas (30). Timple e Runyum formularam uma classificação para as micobactérias com base em diferenças laboratoriais, de acordo com a velocidade de crescimento e a capacidade em produzir pigmentos em meio de cultura (31). As micobactérias foram divididas em quatro grupos e são apresentados no quadro 1. É importante ressaltar que a classificação de Runyon tem muita utilidade quanto ao aspeto microbiológico, pois quanto aos aspetos clínicos epidemiológicos já não possui o mesmo

valor, uma vez que se associam, em um mesmo grupo, espécies reconhecidas como patogénicas ao homem e outras não patogénicas.

Quadros 3.1 Classificação das micobactérias

Grupo I	Estão incluídas as micobactérias de crescimento lento. Produzem colónias com pigmentação de cor amarelada, quando expostas à luz. São, por isso, denominadas "fotocromógenas", incluindo-se nesse grupo <i>M. kansasii</i> , <i>M. simiae</i> e <i>M. marinum</i> .
Grupo II	Micobactérias de crescimento lento, que também produzem colónias com pigmentação de cor amarelada, porém, independente de exposição à luz. São denominadas "escotocromógenas", sendo representantes desse grupo <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. flavescens lavesceus</i> e <i>M. xenopi</i> .
Grupo III	Micobactérias de crescimento lento, que podem produzir pequena ou nenhuma pigmentação, mesmo quando expostas à luz intensa. São denominadas acromógenas, sendo representantes desse grupo o complexo <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. triviale</i> e <i>M. gastri</i> .
Grupo IV	Micobactérias de crescimento rápido (três a sete dias) que podem apresentar ou não pigmentação, sendo representante desse grupo o complexo <i>M. fortuitum</i> e <i>chelonae</i> .

Fonte: adaptado de (32)

As micobactérias foram classificadas por Kazda, segundo a sua patogenicidade em seres humanos, em três grupos: estritamente patogénicas, potencialmente patogénicas e raramente patogénicas ou saprófitas. As espécies estritamente patogénicas incluem as do CMTB e *M. leprae*, as classificadas como potencialmente patogénicas e patógenos raros compreendem as MNT (Tabela 3.1) (33).

Quadros 3.2 Classificação da patogenicidade das espécies

Patogénicas				
<i>M. leprae</i>				
<i>M. caprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>
Potencialmente patogénicas				
<i>M. avium</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. avium subsp paratuberculosis</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i>
Raramente patogénicas				
<i>M. agri</i>	<i>M. cooki</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. alchienseM.</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. homossenze</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. austroafricanm</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. nonchromogenicm</i>	<i>M. shimoidei</i>	<i>M. gilvum</i>
<i>M. chubuense</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>
<i>M. confluentis</i>	<i>M. gastris</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. sphagn</i>	

Fonte: (33).

3.3 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

Estima-se que um terço da população mundial está infetada pelo *M. tuberculosis* e anualmente surgem 8-10 milhões de novos casos de tuberculose, entre as quais 95% ocorrem em países em desenvolvimento, resultando 2-3 milhões de mortes (34). Em 2010, havia uma estimativa de 8,8 milhões de casos incidentes de TB (variação de 8.5 a 9.2 milhões) no mundo, equivalente a 128 casos por 100 000 habitantes (incluindo as mortes por tuberculose entre pessoas HIV-positivas) (35). A maior parte do número estimado de casos em 2010 ocorreu na Ásia (59%) e África (26%) menores proporções

de casos ocorreu na Região do Mediterrâneo Oriental (7%), a Região Europeia (5%) e da Região das Américas (3%) (34–36).

Segundo Organização Mundial da Saúde (OMS) os países com o maior número de casos incidentes em 2010 foram a Índia (2,0 milhões a 2,5 milhões), China (0.9 a 1.2 milhões), África do Sul (0,40 milhões a 0,59 milhões), Indonésia (0.37 a 0.54 milhões) e Paquistão (de 0.33 a 0.48 milhões). A Índia por si só representa uma estimativa de um quarto (26%) dos casos de TB em todo o mundo, no entanto, China e Índia juntas representaram 38%. Dos 8,8 milhões de casos incidentes em 2010, cerca de 1,0 milhões de 12 milhões (12-14%) eram indivíduos com VIH, com uma melhor estimativa de 1,1 milhões (13%). A proporção de casos de TB coinfectados com VIH é maior em países da Região Africano, representando 82% dos casos de TB entre as pessoas com VIH (36). Havia uma estimativa de 12,0 milhões de casos prevalentes (intervalo de 11,0 milhões de 14,0 milhões) de TB em 2010. Isto é equivalente a 178 casos por 100 000 habitantes. Globalmente, as taxas de prevalência têm caído desde 1990, com um rápido declínio após 1997. No entanto, as previsões atuais sugerem que a meta da Parceria Stop TB de reduzir para metade a prevalência da tuberculose em 2015 em comparação com uma linha de base de 1990 não será atingida (36).

Regionalmente, as taxas de prevalência estão em declínio em todas as seis regiões da OMS. A Região das Américas reduziu para metade o nível de prevalência de TB de 1990, bem antes do ano de 2015, e as regiões do pacífico ocidental está perto de fazê-lo. Reduções na prevalência de TB no Mediterrâneo Oriental, da Europa e Sudeste da Ásia têm sido consideráveis desde 1990, e parecem ter acelerado desde 2000. No entanto, as previsões atuais sugerem que a meta de 2015 não será alcançada. Na Região Africano, as estimativas das taxas de prevalência de TB estão longe do nível de alvo, e reduzir para metade a taxa de 1990 até 2015 parece improvável (36).

Globalmente, uma estimativa de 10 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose em 2019, não houve muita diminuição nos últimos anos (37). Houve uma estimativa de 1,2 milhões de mortes por TB entre pessoas VIH-negativas em 2019 (uma redução de 1,7 milhões em 2000), e um adicional de 208 000 mortes (intervalo, 177 000 – 242 000) entre pessoas VIH-positivas (uma redução de 678 000 em 2000) (37). Homens

(com idade ≥ 15 anos) representaram 56% das pessoas que desenvolveram TB em 2019; as mulheres representavam 32% e as crianças (< 15 anos), 12%. Entre todas as pessoas afetados, 8,2% eram pessoas vivendo com VIH. A taxa de incidência de TB a nível nacional de cada país varia de menos de 5 a mais de 500 casos novos e de recidiva por 100.000 habitantes por ano. Em 2019, 54 países tinham uma baixa incidência de TB (< 10 casos por 100.000 habitantes por ano), principalmente na Região das Américas e na Europa, além de alguns países nas regiões do Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental. Esses países estão bem posicionados para encaminhar a eliminação da TB (37).



Figura 3.2 Países que tiveram pelo menos 100.000 casos incidentes de TB em 2019.

Fonte: (37)

A tuberculose resistente a medicamentos continua a ser uma ameaça à saúde pública. Em todo o mundo em 2019, perto de meio milhão de pessoas desenvolveram TB resistente à rifampicina (RR-TB), dos quais 78% tinham TB multirresistente (MDR-TB) (37). Os três países com a maior parcela da carga global foram Índia (27%), China (14%) e Federação Russa (8%). Em todo o mundo em 2019, 3,3% dos novos casos de TB e 17,7% dos casos tratados anteriormente tinham MRTB / RR. As maiores proporções ($> 50\%$ em casos tratados anteriormente) ocorreram em países da antiga União Soviética (37).

3.4 TUBERCULOSE PULMONAR PRIMÁRIA

É mais comum em crianças e clinicamente apresenta-se na maior parte das vezes, de forma insidiosa, normalmente é caracterizado por febre com temperatura baixa, podendo chegar a 39°C e persistir em média por 14 a 21 dias. Em geral, a febre desaparece em 10 semanas em 98% dos casos. Também o paciente pode apresentar dor torácica pleurítica ou não pleurítica. Outros sinais e sintomas são artralgias generalizados, fadiga e tosse. O colapso associado do lobo médio pode complicar a linfadenopatia (38). Uma das formas mais graves de tuberculose primária é a forma miliar que é caracterizada por disseminação hematogénica, e que apresenta lesões granulomatosas muito pequenas e difusas, que atingem não apenas os pulmões, mas também muitos órgãos. Os órgãos com alto fluxo sanguíneo são mais afetados, como o baço, fígado, pulmões, medula óssea e rins (20,21).

3.5 TUBERCULOSE PÓS PRIMÁRIA E REATIVADA

Essa forma pode ocorrer também em indivíduos imunocompetentes, tanto pela infecção natural quanto pela administração da vacina Bacilo de Calmette de Guérin (BCG), sendo responsável por 90% dos casos diagnosticados na população adulta. Resulta da reativação de um foco latente, formado por ocasião da infecção primária. À medida que a doença se agrava, pode ocorrer tosse produtiva, expectoração (raramente com odor fétido) e sintomas localizados, como hemoptise e dor torácica devido ao acometimento pleural (38). Os sinais e sintomas referentes as vias respiratórias superiores resultam-se das secreções pulmonares altamente contagiosa que se espalham para a laringe. Os estertores podem ser audíveis durante toda inspiração, ou podem ser percebidos também depois de uma tosse curta denominadas estertores pós-tosse (39).

3.6 TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR

A tuberculose extrapulmonar resulta da disseminação hematogénica ou extensão direta de órgãos adjacentes e pode envolver a laringe, linfonodos, pleura, trato gastrointestinal, trato geniturinário, sistema nervoso central ou ossos. Com exceção da tuberculose laríngea, a maioria das doenças extrapulmonares não é contagiosa (40).

A maior parte das formas extrapulmonares acontece em órgãos sem condições ótimas de crescimento bacilar, sendo frequentemente tem uma instalação insidiosa e evolução lenta. As formas mais comuns, com pequenas variações de posição em diferentes períodos e regiões, são pleural, linfática, osteoarticular, geniturinária e intestinal, embora praticamente qualquer local do organismo possa ser afetado pela doença (Quadro 3.3).

Quadros 3.3 As formas mais comuns de tuberculose extrapulmonar.

1. Pleural

2. Ganglionar

3. Osteoarticular

4. Geniturinária

5. Intestinal

6. Peritoneal

7. Pericárdica

8. Tuberculose do sistema nervoso central

9. Cutânea

3.7 TUBERCULOSE ASSOCIADA A VIH

O advento da epidemia do VIH nos países com alta prevalência da tuberculose, tem acarretado aumento significativo de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa e formas extrapulmonares. Embora sejam menos infetantes que os pacientes com baciloscopia positiva, estes pacientes, em geral, são imunocomprometidos (41). A sinergia entre a tuberculose e o vírus da imunodeficiência humana (VIH) é responsável

pelo aumento da morbimortalidade nos pacientes com VIH, sendo associado a 13% das mortes por VIH no mundo (42,43).

Em 1981, quando o primeiro caso de VIH foi diagnosticado, estimava-se que um terço da população mundial estava infetado pelo *M. tuberculosis*. No entanto, a disseminação da infeção pelo VIH no mundo levou a alterações nos mecanismos de defesa contra o agente causal da tuberculose, tornando-se a infeção pelo VIH o maior fator de risco para a progressão da infeção latente pelo *M. tuberculosis* (43). Devido à maior frequência de formas extrapulmonares e disseminadas em pessoas infetadas pelo VIH, a investigação adequada requer uma estrutura diagnóstica que envolve a realização de procedimentos invasivos para coleta de espécimes clínicos como líquido pleural, líquor ou biópsia de órgãos sólidos (linfonodos e pleura). O diagnóstico bacteriológico é sobretudo mais importante na co infeção, para confirmar a presença de tuberculose ativa, realizar o diagnóstico diferencial e conhecer o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para tuberculose (44).

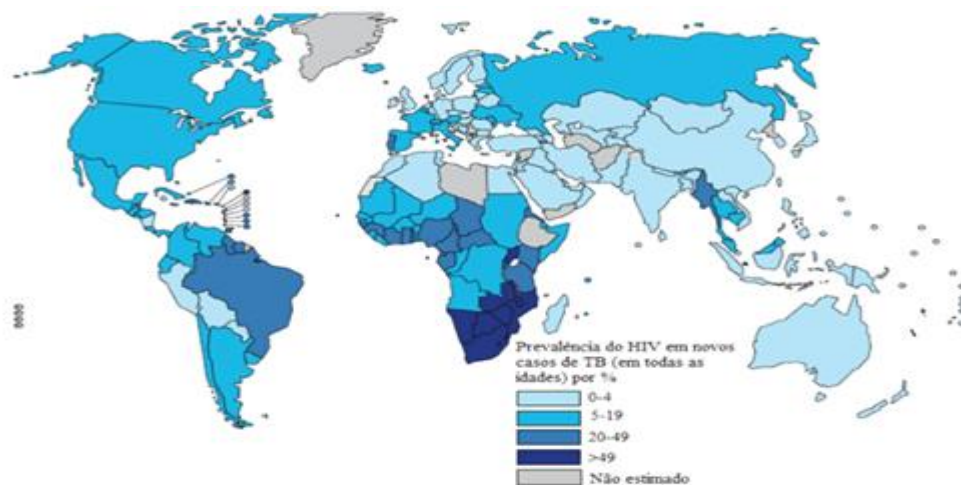


Figura 3.3 Prevalência do VIH em novos casos de tuberculose (%).

Fonte: (36)

3.8 TRANSMISSÃO DA TUBERCULOSE

M. tuberculosis é o agente que mais frequentemente provoca doença no homem, sendo o mais importante do ponto de vista clínico e de Saúde Pública. É um bacilo aeróbio, transmitido pela via aérea e cujo único reservatório conhecido é o homem (45). Quando um indivíduo com TB ativa, pulmonar ou laríngea, tosse, espirra, canta ou fala produz partículas microscópicas (aerossóis) de 1-5 µm de diâmetro que contêm *M. tuberculosis*. Estas partículas podem formar-se também durante a realização de tratamentos com aerossóis, indução da expectoração, broncoscopia e na manipulação de lesões, secreções e outros produtos de doentes com TB principalmente no ambiente hospitalar (45). O indivíduo infetado produz partículas de diferentes tamanhos. As maiores (> 10 µm) devido ao seu peso sedimentam nas vias aéreas superiores, ficam retidas na camada mucociliar, sendo posteriormente levadas até à orofaringe onde são deglutidas ou expulsas pela expectoração, não são, portanto, infecciosas. As de 5-10 µm de diâmetro alcançam as vias aéreas mais proximais, no entanto as condições locais não permitem a replicação do *M. tuberculosis* (46).

As partículas mais perigosas são as de 1-5 µm de diâmetro, com cerca 1-5 bacilos/gota, que ao atingirem o alvéolo, fornecem ao bacilo as condições ótimas para a sua multiplicação (45). Após inalação, se as gotículas ficassem no trato respiratório superior (nariz e garganta), é improvável de acontecer a infeção. Todavia normalmente as gotículas que contêm um a dois bacilos, migram até a árvore brônquica e atingem os alvéolos onde os bacilos iniciam o processo patológico da doença caso sobreviveram as defesas primárias e se multiplicarem dentro do macrófago alveolar. Os indivíduos com infeção latente ou melhor que não apresentam a doença em sua forma ativa não podem transmitir bacilo (18). O bacilo de Koch reproduz-se de 20 em 20 horas, aproximadamente. Assim, no fim de dez dias, um só bacilo dá origem a uma colónia contendo 5.000 bacilos. Essa velocidade de multiplicação e essa quantidade de bacilos explicam a rápida evolução da doença, com o aparecimento a curto prazo de lesões extensas.

Um paciente com tuberculose não diagnosticado, não tratado infecta cerca de 10 a 12 pessoas durante um ano (47). Sem tratamento específico, os indivíduos com tuberculose grave vivem dois anos, em média, e infetam aproximadamente 20 a 25

peças. Entretanto, logo depois de serem administrados dois ou três antimicrobianos antituberculosos em associação e de forma regular, os pacientes deixam transmitir este patógeno em 15 dias. Assume-se que indivíduos infetados podem desenvolver tuberculose por um dos dois mecanismos patogénicos: pela progressão direta (onde a doença se desenvolve logo após a infeção) ou reativação endógena (onde a doença pode se desenvolver depois de muitos anos da infeção) (47).

3.9 SINTOMAS DA TUBERCULOSE

Com base em critérios clínicos e de saúde pública, os pacientes com TB podem ser classificados em três grupos. O primeiro grupo é representado por portadores, ou seja, indivíduos com infeção latente de TB (ILTB); onde esses indivíduos são assintomáticos e não são capazes de transmitir a doença (48).

O segundo grupo é o de indivíduos com TB ativa, que é a forma transmissível da TB; tem sintomas específicos, como febre, fadiga, falta de apetite e perda de peso, tosse persistente e hemoptise. No entanto, alguns pacientes com TB ativa com cultura positiva podem ser assintomáticos e são separados em um terceiro grupo é considerado como casos de TB subclínica (49). *M. tuberculosis* se multiplica a cada 12- 20h, e os sintomas da tuberculose iniciam aos poucos. Geralmente, o doente só se convence de que está doente depois de 30 a 60 dias dos sintomas iniciais, quando o escarro já se tornou bacilífero e já passou a fase de contaminar outras pessoas, fechando o ciclo epidemiológico de transmissão. Essa é uma característica muito importante da tuberculose (48). Os principais sintomas e sinais da tuberculose, também chamados de “marcadores clínicos da tuberculose” estão citados no Quadro 3.4. Esses “marcadores”, associados a uma radiografia de tórax “típica de tuberculose”, permitem o diagnóstico presuntivo da doença, mesmo quando a pesquisa de BAAR no escarro é negativa (50). Para o diagnóstico com base na cultura, o meio de Löwenstein-Jensen é a mais usada para cultura de escarro no nosso meio, embora essa técnica é tenha maior sensibilidade e seja considerada gold standard para o diagnóstico da tuberculose, demora cerca de 60 dias para confirmar a doença, um tempo bastante longo.

Quadros 3.4 Marcadores clínicos da tuberculose

Tosse
Expetoração
Febre vespertina
Sudorese noturna abundante
Emagrecimento acentuado
Fraqueza
Anorexia
Hemoptise
Dor torácica moderada
Evolução não aguda

A tosse, que dura por mais de duas semanas, é o sintoma mais precoce da tuberculose pulmonar, mas geralmente as pessoas raramente, procura uma unidade de saúde no início dos sintomas, pois não associa esse sintoma e a expetoração que surge a seguir como uma doença infetocontagiosa, pois são atribuídos a uma gripe mal curada, a bronquite tabágica ou a outra situação clínica qualquer. Com isso apenas quando surgem outros sintomas é que ocorre a necessidade de obter auxílio médico, o que vai fazer com que o tempo seja maior entre o primeiro sintoma e o diagnóstico da doença (51).

3.10 TRATAMENTO DE TUBERCULOSE

Segundo a OMS a tuberculose tem cura. É tratada por um curso padrão de 6 meses e o tratamento inicial na fase intensiva é com 4 antibióticos. Os medicamentos comuns incluem rifampicina e isoniazida. Em alguns casos, a bactéria da TB não responde aos medicamentos padrão. Sendo assim, o indivíduo tem TB resistente a medicamentos. Os tratamentos da tuberculose resistente a medicamentos são mais longo e mais complexo (52).

3.10.1 Tratamento de tuberculose pulmonar

Quadros 3.5 Tipos de resistência a antibiótico que existe de TB

Monorresistência	Resistência a 1 antibacilar de 1ª linha
Polirresistência	Resistência a mais do que 1 antibacilar de 1ª linha (exceto H e R em simultâneo)
Tuberculose Multirresistente (MDR-TB)	Resistência simultânea a, pelo menos, isoniazida e rifampicina
Tuberculose Extensamente Resistente (XDR-TB)	Resistência a isoniazida e rifampicina (MDR) + Resistência a 1 fluoroquinolona (FQ) + Resistência a 1 injectável 2ª linha amicacina (Am), capreomicina (Cm), kanamicina (Km)
Resistência à Rifampicina (RR-TB)	Resistência à R detectada por testes fenotípicos ou genotípicos, com ou sem resistência a outros antibacilares. Inclui qualquer resistência à R, quer seja monoresistência, multirresistência ou polirresistência.

De acordo com DUARTE R., *et al.*, (2010) as estirpes resistentes à R são as que pode ser seleccionada para tratamento com regime de TBMR. Podem ser suscetíveis ou resistentes à H (TBMR), resistentes a outros fármacos de 1ª linha (polirresistência) ou de 2ª linha (XDR-TB). Os casos de RR-TB e MDR-TB são frequentemente agrupados como MDR/RR-TB. Em doentes com TB com suscetibilidade confirmada à rifampicina e resistência à isoniazida, o tratamento recomendado é R+Z+E+levofloxacina com uma duração de 6 meses. No esquema de tratamento destes doentes não está recomendado adicionar estreptomicina ou outros agentes injetáveis.

Tabela 3.1 Classificação dos fármacos e doses recomendadas.

Nome	mg/Kg	Dose média [máxima] [mg]
-------------	--------------	---------------------------------

Isoniazida (H)	5	300 [300]
Isoniazida Crianças	10 (10 - 15)	300
Rifampicina (R)	10	600 [600]
Rifampicina Crianças	15 (10 - 20)	600
Pirazinamida (Z)	25 (20 - 30)	1500 [2000]
Pirazinamida Crianças	35 (30 - 40)	2000
Etambutol (E)	20 (15 - 25)	1200 [2000]
Etambutol Crianças*	20 (15 - 25)	1000
Rifabutina (RIF)	5	300 [300]

In vitro, foi demonstrado que, quando as mutações que proporcionam resistência à isoniazida são no gene *inhA*, aumentar a dose de isoniazida é eficaz. Assim sendo, adicionar H numa dose máxima de 15 mg/Kg/dia pode ser considerado. Mutações no gene *katG* proporcionam elevada resistência à H (uma vez que a H é um pro-fármaco que é ativado pela enzima codificada pelo gene *KatG*), pelo que, diante disso administração de H em doses elevadas é ineficaz (53). Em doentes cujo diagnóstico de TB resistente à H é muito provável, mas os resultados do TSA (Teste de sensibilidade antibiótico) ainda estão em curso, deve ser iniciado o esquema de tratamento referido juntamente com a isoniazida. Se o TSA apresentar suscetibilidade à H, deve-se suspender a levofloxacina e o doente deve continuar o tratamento de forma a completar 2HRZE/4-10HR (54).

Em doentes nos quais a resistência à H é observado apenas após o início do tratamento com o esquema clássico 2HRZE/4HR, os fármacos RZE devem ser continuados (ou a Z e E devem ser reintroduzidos se já se encontrarem na fase de continuação) e a levofloxacina deve ser adicionada, desde que a resistência à rifampicina seja excluída (55). O esquema R+Z+E+Levofloxacina deve ter a duração necessária para que o doente cumpra 6 meses de levofloxacina. Bem como, em casos em que o diagnóstico de TB resistente à H é feito após o início de tratamento de 1ª linha para a TB, pode implicar que o doente venha receber mais do que 6 meses de R+Z+E. Quando a confirmação da resistência à isoniazida é muito tardia (ex: 5 meses no esquema de 2HRZE/4HR) a decisão de iniciar R+Z+E+Levofloxacina naquele momento vai depender da evolução clínica do doente e microbiologia da expectoração (56).

A levofloxacina deve ser primeira escolha em esquemas com fluoroquinolonas, uma vez que, seu perfil de segurança é bem caracterizado em relação a outras FQ e apresenta menos interações com outros fármacos quando comparada com a moxifloxacina, nomeadamente com a rifampicina (56). A associação de levofloxacina ao esquema R+Z+E é recomendada em todos os doentes com TB resistente à H, excepto em casos em que a resistência à rifampicina não possa ser excluída, tipo resistência suspeita ou confirmada à levofloxacina, intolerância ou contra-indicação conhecida às fluoroquinolonas, risco suspeito ou conhecido de prolongamento do intervalo QTc e gravidez ou amamentação (não se tratando de uma contra-indicação absoluta). O esquema alternativo deve-se fazer ao doente quando a levofloxacina não puder ser utilizada por toxicidade ou resistência: 6 RZE. Não é aconselhável substituir a levofloxacina por um agente injetável. Quando é confirmada ou se suspeita de uma resistência adicional (pirazinamida e/ou FQ), os esquemas de tratamento devem ser definidos de forma individual com outros fármacos de 2ª linha (54).

3.10.2 Tratamento da tuberculose extrapulmonar

Segundo American Thoracic Society Documents, (2003), qualquer órgão ou tecido pode ser afetado pela, sendo as formas não pulmonares é o que mais acomete as crianças e os imunodeprimidos.

Tabela 3.2 - Tratamento da tuberculose extrapulmonar: esquema e duração

Forma	Fase inicial*	Fase manutenção	Duração total (meses)
SNC (incluindo meninges)	HRZE (2 meses)	HR (10 meses)	12
Ganglionar	HRZE (2 meses)	HR (4 meses)	6-9 **
Pericárdica	HRZE (2 meses)	HR (4 meses)	6
Disseminada	HRZE (2 meses)	HR (10 meses)	12
Osteoarticular	HRZE (2 meses)	HR (10 meses)	12
Outras formas	HRZE (2 meses)	HR (4 meses)	6

* 2 Meses / 56 tomas ** O tratamento deve ser prolongado se a resposta for lenta

Os conceitos no que se diz respeito ao tratamento da tuberculose extrapulmonar são priorizados em relação aos da tuberculose pulmonar. Os regimes de 6 meses que

incluem H e R são eficazes para os casos de tuberculose extrapulmonar com exceção da meningite tuberculosa ou da tuberculose óssea. Neste caso, é recomendado um tempo de tratamento de 12 meses. O prolongamento do tratamento também é recomendado perante a evidência de uma resposta lenta, como ocorre frequentemente nos casos de tuberculose ganglionar ou de órgão. A associação de corticosteroides está recomendada no caso de tuberculose pericárdica e meníngea (57).

Tabela 3.3 - Corticoterapia na TB extrapulmonar: indicação, doses e duração do tratamento.

Indicação	Fármaco	Dose	Duração
TB pericárdica	Prednisolona	1mg/Kg/dia*	Prednisolona
	Prednisolona	Adultos: Esquema com R: 20-40 mg/dia	Durante 4 semanas e com redução desde então durante 4 semanas
TB meníngea	Dexametasona	Esquema sem R: 10-20mg/dia	
		Crianças: 4 mg/kg/dia (máx 60mg)	

* Adultos e crianças

3.11 TRATAMENTO EM SITUAÇÕES PARTICULARES

3.11.1 Na grávida

Na grávida, o diagnóstico e tratamento devem ser iniciados de forma precoce, independentemente do trimestre da gravidez, pelo risco que a doença constitui para a mãe e para o feto. Os antibacilares de primeira linha são considerados seguros na grávida, sendo que o risco de toxicidade é ultrapassado pela vantagem do tratamento da doença. A amamentação deve ser encorajada, uma vez que a concentração dos fármacos no leite materno é mínima. Se necessária a separação da mãe e filho, deverá extrair-se o leite materno e dar ao recém-nascido (58).

O esquema e duração do tratamento são semelhantes ao dos doentes em geral, exceto a utilização de estreptomicina por ser ototóxica para o feto, estando contraindicada na gravidez. Recomenda-se a administração de piridoxina (dose mínima recomendada – 25 mg/dia) a todas as mulheres medicadas com isoniazida que estejam grávidas ou em

período de amamentação (neste caso, os recém-nascidos alimentados exclusivamente com leite materno também devem fazer suplementação com piridoxina na dose de 1mg/Kg/dia), (57).

3.11.2 Na criança

Segundo CARVALHO C. A. *et al.*, (2020), as formas mais frequentes de manifestação de tuberculose nesta classe etária têm pouca carga bacilífera, havendo pouco risco de desenvolvimento de resistências. No tratamento, poderá ser considerado esquema com 3 fármacos (2HRZ) apenas quando é conhecido o perfil de suscetibilidades do caso-índice. Em geral, o esquema de tratamento da tuberculose na criança é o mesmo do utilizado nos adultos, com a exceção do etambutol, que não é usado por rotina (59). O etambutol deve ser introduzido, independentemente da idade, se a criança residir em locais onde a prevalência de resistência à H é elevada ou em locais de baixa prevalência de resistência à isoniazida mas apresente uma forma extensa de TB ou TB osteoarticular, miliar ou meníngea (58).

No entanto, algumas crianças e adolescentes podem apresentar manifestações da doença “tipo adulto”, com infiltrado no lobo superior, cavitação ou com produção de expectoração. Nestas situações, a fase inicial deve incluir os quatro fármacos até à obtenção de antibiograma.

3.11.3 No doente com coinfeção pelo VIH

O tratamento da tuberculose nos doentes que vivem com infeção VIH obedece aos mesmos princípios dos doentes sem infeção pelo VIH e todos devem iniciar tratamento antibacilar de imediato (60). Num doente com infeção pelo VIH e já sob ARV, estes não devem ser interrompidos. As interações entre os fármacos anti bacilares e os ARV devem ser revistas e tidas em consideração (tabela 3.6 e 3.7) e, se necessário, devem ser alterados os esquemas terapêuticos de forma a minimizar o risco de interação e toxicidade. Tratando-se de um doente com infeção pelo VIH sem terapêutica anti retrovírica no momento do diagnóstico de tuberculose, o início dos antibacilares é prioritário. Este momento coincide com a redução significativa do número de comprimidos, com a diminuição da probabilidade de ocorrência de efeitos adversos e com uma fase em

que o estado global do doente regra geral é significativamente melhor, fatores que podem contribuir para uma melhor tolerância e garantir maior adesão à terapêutica (61).

Quadros 3.6 Regime terapêutico preferencial TB/VIH

ARV	Anti –TB	Comentários
EFV + TDF/FTC ou ABC/3TC	HRZE	Os ARV e antibacilares não necessitam de ajuste posológico.

EFV- Efavirenz; TDF – Tenofovir; FTC – Entricitabina; ABC – Abacavir; 3TC – Lamivudina

De qualquer modo, o início de ARV deve ter em conta também outros fatores, nomeadamente a presença de coinfeções e o risco de desenvolvimento de Síndrome de Reconstituição Imunológica. No doente que inicia ARV após diagnóstico de tuberculose, este síndrome caracteriza-se por um agravamento clínico e radiológico paradoxal, que surge habitualmente no 1º mês após início de ARV e é mais frequente entre doentes com contagem basal de linfócitos T CD4 <50/mm³, com elevada carga vírica e bacilar e com intervalo mais curto entre início de ARV e antibacilares (62).

4 MYCOBACTERIUM BOVIS (BCG)

4.1 A CEPA BCG

O bacilo Calmette e Guerin (BCG) foi criado a partir de *M. bovis*, uma cepa que causa tuberculose bovina. Entre 1908 e 1921 a sua virulência foi atenuada e a cepa foi estabilizada em não virulento, por 230 passagens sucessivas em meio impregnado com bile de boi. A cepa resultante, a variante BCG, diferia da cepa original, perdendo seu potencial patogênico. Porém, o mais primordial, a cepa manteve sua imunogenicidade, uma vez que poderia engendrar um tipo de hipersensibilidade retardado (DTH) à tuberculina e poderia proteger contra cepas virulentas de *M. bovis* (63). Contudo, o crescimento, a morfologia e a composição química da cepa filha são semelhantes às do progenitor virulento, mas são suficientemente diferentes para permitir a discriminação entre eles.

4.2 CEPAS FILHAS DE BCG

O desenvolvimento da cepa BCG por Albert Calmette e Camille Guerin no Instituto Pasteur resultou na primeira vacinação em 1921. Isso foi seguido pela disseminação da cepa para muitos países em todo o mundo. Todas as cepas foram mantidas por mais de 30 anos por passagem em meios de cultura naturais a cada 3 semanas. A natureza certa desses meios varia de um país para outro e pode perfeitamente ser a causa das diferenças em a reatogenicidade, notada pela primeira vez na década de 1950. A OMS recomendou na década de 1960, a estabilização das características biológicas dessas cepas filhas por liofilização e armazenamento das amostras em baixa temperatura, com o objetivo de evitar a produção de mutantes menos imunogênicos e sua seleção por passagens sucessivas em meios de cultura. Estudos inter laboratoriais foram realizados sob a égide da OMS e International Alliance for Biological Standardization (IABS) para delimitar melhor as diferenças entre as cepas filhas de BCG, que são geralmente conhecidos pelo nome do país ou laboratório em que são mantidas. Os resultados mostraram-se claramente; que hoje em dia as cepas não são idênticas. As diferenças estavam na morfologia, bioquímica, crescimento e grau de imunogenicidade, sendo importante a imunidade do tipo celular gerada pelo BCG (63–65).

Existem quatro cepas filhas a partir das quais grandes quantidades de vacina são produzidas em todo o mundo e são fornecidas pela UNICEF. A cepa francesa 1173 P2 é usada na França pela 'Pasteur Vaccins' e em 14 outros países para sua própria produção de vacina. As características de manutenção e biológicas são conhecidas e foram descritas, uma vez que esta cepa tem sido utilizada em diversos estudos (63). A cepa Glaxo 1077 foi obtida em Copenhague na década de 1950. Entretanto, é diferente da cepa dinamarquesa 1331 da qual é derivado. Estudos comparativos mostraram grandes diferenças entre as duas cepas, resultando em nomes diferentes e no uso de uma massa bacteriana maior por dose nas Glaxovacinas.

4.3 A VACINA BCG

Segundo MOSTOWY S. *et al.* (2003) vacina BCG é uma forma mutada do agente causador da tuberculose bovina, *Mycobacterium bovis*, que se tornou atenuado após uma série de subcultivos em meio ox bile, quando Calmette e Guérin queriam provar a hipótese de que o bacilo presente no tubérculo de bovinos infetados poderia transmitir tuberculose pulmonar por administração oral como, por exemplo, ingestão de carne ou leite de animais infetados (66). Entretanto, após o 39º subcultivo, a cepa foi incapaz de matar animais experimentais, e ainda, depois de 200 subcultivos, a cepa não mostrou reversão da virulência, fato que permitiu concluir que a mutação de atenuação é uma deleção. Foi demonstrado que esta atenuação se dá pela perda da região genômica RD1. O locus RD1 está deletado em todas as cepas de *M. bovis* BCG, mas está presente nas cepas virulentas de *M. bovis* e *M. tuberculosis*. A deleção da região RD1 provoca a perda da atividade citolítica do *M. bovis* BCG, faz com que resulta numa invasão reduzida dos tecidos (67). A preparação da vacina é feita a partir de uma determinada cepa de BCG, é composta por bacilos vivos atenuados, capazes de induzir proteção contra a tuberculose e hipersensibilidade tardia na prova intradérmica da tuberculina.

Segundo GHEORGHIU M. (1988), a qualidade da vacina depende de vários fatores como a imunogenicidade da cepa e a proporção de bacilos vivos para mortos na preparação. Se a proporção for alta, as reações locais são menores e a imunogenicidade maior, aprovando o uso de doses menores com efeitos colaterais mínimos para dar imunização satisfatória. E esta proporção de bactérias vivas para bactérias mortas varia

excessivamente (três logaritmos), dependendo dos métodos de cultura usados e da fabricação. O BCG crescido disperso evita a aglutinação dos bacilos e também a destruição das células pela trituração da massa bacilar trivial ao método clássico (63). Do mesmo modo, o método de liofilização e preparação também influenciam a quantidade de células vivas. Uma percentagem superior a 10% de uma suspensão fresca com uma estabilidade é indispensável e também a estabilidade ao calor de pelo menos 20% após exposição a 37 ° C durante um mês. Contudo, outros estudos têm demonstrado que só a deleção da região RD1 não seria responsável pela atenuação do *M. bovis* e que outros genes estariam envolvidos. As vantagens e as desvantagens da vacina BCG têm sido debatidas, uma vez que seu uso e os níveis de proteção fornecidos pela vacinação contra a doença pulmonar podem variar de 0% a 80% (68).

4.4 A VACINAÇÃO BCG

Após ser escolhida a vacina mais eficaz, faz-se a seleção do método de vacinação. A proteção verificada não depende só da vacina, mas também: da via de vacinação; a dose; o tempo entre a vacinação e a exposição à infecção. Apesar de que seja geralmente aceito que a injeção intradérmica é o melhor método de vacinação, isso é difícil em recém-nascidos que requerem: precisão na técnica de injeção; precisão na dose; dados de base sobre a idade, vacina e doses para administrar DTH dentro das normas aceitas (> 50 a 100%) com um mínimo tolerável de adenite supurativa (<1%), (69).

Tendo sido vacinadas pelo menos 3 bilhões de pessoas em todo mundo, o Bacilo Calmette-Guérin (BCG) é única vacina disponível contra tuberculose derivada do *M. bovis*, está disponível desde a década de 1920. Contudo a cada ano, a vacina é administrada a mais de 100 milhões de pessoas. A vacina BCG não tem a capacidade de impedir a infecção e nem o desenvolvimento da tuberculose pulmonar, mas ela pode conferir certo grau de proteção para a meningite tuberculosa e para as formas disseminadas da doença (66). A eficácia da vacina em prevenir tuberculose é extremamente baixa, embora ela induza uma forte resposta imune humoral e celular, particularmente a tuberculose pulmonar em adultos. A vacina não é utilizada somente como vacina contra a tuberculose, a BCG também é utilizada por urologistas para o

tratamento de carcinoma superficial de bexiga, através de infusão intravesical do Bacilo Calmette-Guérin (70).

Geralmente, essa terapia é bem tolerada e possui efeitos colaterais brandos, localizados e autolimitados. Podem ser muito serias as complicações em longo prazo, embora tenham uma baixa frequência. Com os relatos de casos de pacientes com carcinoma superficial de bexiga que foram tratados com BCG, desenvolveram infecção disseminada e foram a óbito, utilização dessa terapia tem sido discutida. Algumas complicações como abscesso, formação de fístula, bacteremia, meningite e até morte, também já foram relatadas após vacinação com BCG (71). Ainda, um grande número de casos de infecção disseminada pelo BCG tem sido relatado, principalmente em pacientes com VIH e imunodeprimidos por outras causas (72).

4.5 REVACINAÇÃO COM BCG

A OMS recomenda o uso de uma dose de BCG na proteção contra TB, levando em conta a ausência de evidências que sustentem administração de doses adicionais de BCG. Os indícios que levam para a utilização da segunda dose da vacina BCG são fundamentados, em sua maioria, em estudos observacionais. Na Hungria, a partir de 1959, foi adotada a revacinação com BCG em menores de 20 anos não-reatores ao PPD (73).

A OMS publicou o último documento de posição do BCG em 2004 e recomendou que, em lugares onde a TB é altamente endêmica ou onde há alto risco de exposição à TB, uma única dose da vacina BCG deve ser administrada a todos os recém-nascidos. Contudo, mesma revisão sistemática da época mostrou poucas evidências de que a revacinação com BCG proporcionava proteção adicional e, por isso, a revacinação não era recomendada (74).

4.6 BCG E VIH

Segundo Hesselning A.C, *et al.*, (2003), a epidemia de VIH contribuiu para o aumento da incidência de TB em vários países do mundo. A explicação primordial para esse fato é que pacientes com VIH apresentam imunodepressão que favorece a reativação de ILTB. Essas crianças desenvolvem linfadenites ou apresentam propagação de BCG após a vacinação (75). Estudo realizado em pacientes imunodeprimidos na África do Sul demonstrou que a grande parte de crianças com VIH e que apresentavam linfadenite e/ou formas disseminadas de TB teve como agente etiológico a vacina BCG dinamarquesa, aplicada no período neonatal. Em uma nota de orientação adicional publicada em 2007, a OMS forneceu orientação específica para crianças infetadas ou expostas ao VIH. Foi recomendado que a vacina BCG não fosse administrada a crianças infetadas pelo VIH (74).

5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM TUBERCULOSE

A detecção rápida de indivíduos com tuberculose, na prática clínica pode ser difícil, pois apenas 44% de todos os novos casos (e apenas 15-20% das crianças são identificados pela presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em esfregaços de escarro (36). Por certo, é considerado definitivo sempre que *M. tuberculosis* é detetado nas amostras humanas por cultura microbiológica no diagnóstico de tuberculose ativa. De maneira clássica o diagnóstico clínico da tuberculose ativa, depende dos resultados de diferentes métodos, incluindo o teste tuberculínico (TT), radiografia de tórax, amplificação de ácidos nucleicos de *M. tuberculosis* e / ou exames patológicos de amostras biológicas (76).

5.1 MEIOS COMPLEMENTARES DE DIAGNÓSTICO

Os sintomas e sinais classicamente relacionados com a TB, são habitualmente inespecíficos. Sendo assim, os meios complementares de diagnóstico desempenham um papel primordial na abordagem desta doença (77). As amostras geralmente encaminhadas para a pesquisa são as de lavado brônquico, expectoração e outras relacionadas com o sistema respiratório. Exames hematológicos, imunológicos, bioquímicos e da área radiológica podem auxiliar no diagnóstico, direcionando o médico para os testes mais específicos (78). As alterações hematológicas que se apresentam com mais frequência são a anemia e leucocitose presentes, cada uma, em 10% dos casos. A elevação dos marcadores bioquímicos de infecção, como a velocidade de sedimentação e proteína C reativa é habitualmente ligeira a moderada. A hiponatremia, presente em cerca de 11% dos doentes, resulta da libertação de hormona antidiurética no pulmão afetado (79). O quadro clínico é inespecífico para o caso de TB urinária, os sintomas mais comuns são disúria, polaciúria e lombalgia, podendo haver piúria e hematúria microscópica (80).

5.2 RADIOLOGIA

A TB pulmonar procede quase sempre com alterações na radiografia de tórax. Virtualmente qualquer alteração radiológica, ou mesmo uma radiografia aparentemente normal pode corresponder a uma TB. Classicamente, a TB pulmonar do adulto apresenta-

se como um infiltrado focal dos lobos superiores, geralmente dos segmentos apical e posterior ou do segmento apical do lobo inferior. E outras possíveis alterações radiológicas encontradas na TB são as cavitações, o padrão miliar, as adenopatias, o derrame pleural e as atelectasias (particularmente na criança).

Segundo CHANG KC, *et al.*, (2008), os doentes com formas avançadas de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) e baixa contagem de linfócitos T CD4 por vezes não têm a apresentação clássica. Nestes doentes, a apresentação clínica da TB, é particularmente atípica, apresentando-se frequentemente com formas não cavitárias, infiltrados nos lobos inferiores, linfadenopatias hilares e derrame pleural. Por outro lado, é geralmente difícil determinar apenas pela radiografia, o grau de atividade da doença. Imagens com densidade cicatricial e mesmo com granuloma calcificado podem estar presentes na TB ativa. Dada a sua maior sensibilidade, a tomografia computadorizada (TC) pode ser necessária no diagnóstico de TB, nomeadamente para esclarecimento de adenopatias, estenoses brônquicas e formas miliares (81).

5.3 EXAME MICOBACTERIOLÓGICO DIRETO

O exame micobacteriológico direto é uma técnica que desempenha um importante papel no diagnóstico presuntivo de TB e é rápida. Baseia-se nas características da parede celular das micobactérias, visto que tem um elevado teor em lípidos, o que lhes confere resistência à descoloração por álcool-ácido. A maioria dos programas de luta contra a TB enquadra o exame micobacteriológico direto na avaliação inicial dos casos suspeitos. De acordo com a OMS, a definição de um caso de TB, a partir de um exame direto positivo baseia-se na presença de pelo menos um BAAR, em pelo menos uma amostra de expectoração.

Para além da positividade do exame direto, o microbiologista deverá fornecer também uma noção quantitativa da carga bacilar. Trata-se de um exame fácil execução, rápido e de baixo custo. É, contudo, uma técnica com baixa sensibilidade, requerendo a presença de, pelo menos, 10⁴ bacilos/ml para se obter um exame positivo. As taxas de positividade variam entre 20 e 80% dos casos confirmados por exame cultural (79). A sensibilidade é mais reduzida nas formas paucibacilares, nas crianças, idosos e imunossuprimidos. Segundo American Thoracic Society: CDC, (2000) por outro lado, o

seu valor preditivo positivo para TB é baixo (50 a 80%) nos locais onde o isolamento de MNT é comum.

Dois procedimentos são comumente usados para a coloração BAAR os métodos fucsina fenicada, que incluem os métodos Ziehl-Neelsen e Kinyoun, e um procedimento com fluorocromos usando auramina-O ou corantes auramina-rodamina. O exame micobacteriológico direto pode ser realizado por pesquisa de BAAR em microscopia direta ou por fluorescência. Por conter uma alta concentração de ácidos micólicos em sua parede celular, faz com que a estrutura dessas bactérias tenha propriedades hidrofóbicas ou lipídicas, pois resistem à descoloração com álcool-ácido (82).

5.3.1 Técnica de Ziehl-Neelsen

A técnica de Ziehl-Neelsen foi desenvolvida por Franz Ziehl e posteriormente melhorada por Friedrich Neelsen, no final do século 19. Essa técnica de coloração é mais agressiva que a técnica de Gram, sendo usada em bactérias que são mal coradas pela coloração de Gram, como por exemplo as bactérias do gênero *Mycobacterium* e *Nocardia*. Existem bactérias que são resistentes à coloração, porém quando coradas, resistem fortemente à descoloração, mesmo quando submetidas a ácidos fortemente diluídos e ao álcool absoluto. Essas bactérias são denominadas de BAAR, (83).

Foram desenvolvidas várias estratégias para aumentar a permeabilidade de micobactérias a corantes aquosos para detectar BAAR em amostras histológicas (84). Inicialmente, foi usada uma solução alcoólica aquecida (40°C) de azul de metileno, hidróxido de potássio e água destilada. De seguida, Bismarck Brown V introduziu para manchar os componentes celulares do hospedeiro e para remover o excesso de corante BAAR. Desde então, as técnicas utilizadas baseiam-se em um mordente, solução de aquecimento e descoloração BAAR (85). No mesmo ano, Ziehl e Neelsen aprimoraram o método substituindo a anilina por ácido carbólico (fenol) e propondo um ácido fraco para descoloração. Em 1887, Neelsen anunciou a ZNT, que ainda é um dos métodos mais amplamente usados para diagnosticar doenças causadas por BAAR (85), particularmente em países em desenvolvimento onde a TB é a principal causa de morte (86).

Na ZNT, após o processo de coloração da amostra, a fucsina de Ziehl irá corar todos os elementos celulares de vermelho, porém após a descoloração com o álcool-ácido, somente os bacilos álcool-ácidos-resistente irão continuar preservando a cor

vermelha, os demais elementos celulares na amostra apareceram descolorados. Então, para podermos visualizar os outros elementos celulares (descolorados) na amostra, deve-se utilizar azul de metileno, que dará um contraste, deixando os elementos celulares em azul e os BAAR continuarão em vermelho. A pesquisa de BAAR em materiais clínicos pode constituir a primeira evidência de doença, permitindo assim o início de um tratamento, enquanto aguarda de cultura. O ZNT se executado corretamente, desde a coleta e processamento da amostra até a baciloscopia, permite uma eficácia diagnóstica em 80% dos casos, e por esta razão não deve ser usado como único meio de diagnóstico laboratorial para a tuberculose (83).

A metodologia da coloração de Ziehl-Neelsen pode ser aplicada a uma infinidade de materiais clínicos, tais como escarro, urina, fezes, LCR etc. Usualmente a principal amostra utilizada é o escarro. A ZNT necessita uma observação com ampliação de 1000x, a medida que para a coloração fluorescente basta uma ampliação de 250 ou 450x. Embora, de acordo com a maioria da literatura, as sensibilidades das duas técnicas sobrepõe-se, alguns autores, têm considerado mais sensível o método da fluorescência, justificando-o pelo facto de ser uma técnica mais rápida e menos enfadado (87).

Suas limitações, de acordo com a OMS, incluem: requerer técnicos bem treinados e motivados, ser pouco sensível em casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, em crianças e em doença extrapulmonar, não permitir distinção entre bactéria sensível ou resistente a drogas, e requerer amostras repetidas (duas ou três). A sensibilidade deste método é baixa, visualizando-se 1 BAAR por campo em aumento de 1000x, estima-se que a amostra contenha cerca de 5×10^5 BAAR por mL. Como o fenol é altamente tóxico, foram desenvolvidas modificações da ZNT original. Uma delas é a técnica Kinyoun, que diminui a concentração do aerossol de fenol, uma vez que a solução de fenol-fucsina não é aquecida (88). Além disso, foi sugerido que a fucsina básica sozinha permite a coloração satisfatória de BAAR, evitando assim o uso de fenol (89), (90).

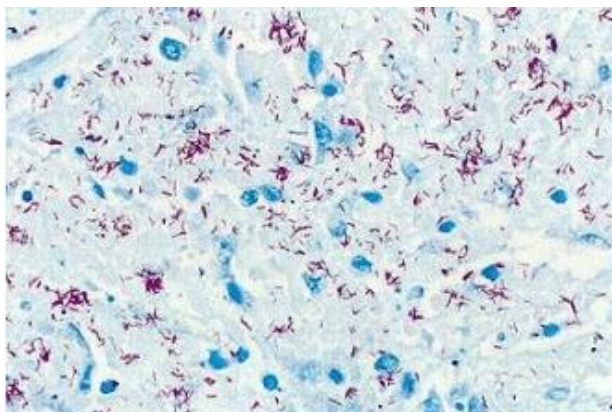


Figura 5.1 Baciloscopia de expetoração pela técnica de Ziehl-Neelsen

Fonte: (91)

Existem entretanto outros métodos com melhor sensibilidade, representados pelos corantes fluorocromáticos como auromina-O e auramina-rodamina, estes métodos também são capazes de detetar as bactérias álcool-ácido-resistentes, através da observação deve ser feita em microscopia de fluorescência onde será permitida a visualização dos bacilos em amarelo-fluorescentes ou laranja-vermelhado, respetivamente (92).

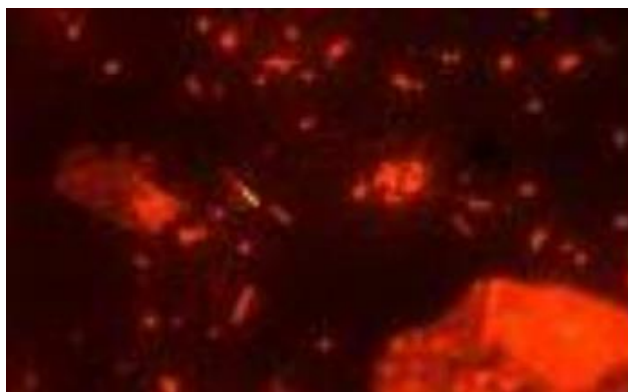


Figura 5.2 Baciloscopia de expetoração pelo método de fluorescência.

Fonte: (77)

5.4 EXAME MICOBACTERIOLÓGICO CULTURAL

Todas amostras clínicas com suspeitas de conter micobactérias devem ser feitas o exame cultural, isto porque, a cultura é muito mais sensível que a microscopia, sendo capaz de detetar apenas 10 bactérias / ml de material. Uma cultura positiva para micobactérias faz o diagnóstico de TB, desta forma o exame cultural continua a ser fundamental, visto que o crescimento dos organismos é necessário para a identificação precisa das espécies; Geralmente, a sensibilidade do exame cultural é de 80-85% e a especificidade de aproximadamente 98% (79).

Um exame cultural positivo possibilita avaliar a sensibilidade aos fármacos antibacilares e demonstrar a eficácia do tratamento, ao indicar quando um doente deixa de ser contagioso. Apesar de o exame cultural se permanecer como gold-standard no diagnóstico e seguimento das infeções micobacterianas é, no entanto, um processo muito demorado, podendo necessitar até 60 dias para se obter um resultado definitivo. Isso sucede pelo facto do crescimento lento das micobactérias, estes demoram de 2 a 7 semanas para mostrar crescimento. Os meios de cultura líquidos (meio Middlebrook) são meios mais enriquecidos, o que lhes confere uma maior sensibilidade. O aparecimento de sistemas automáticos e semiautomáticos de leitura do crescimento das micobactérias em meio líquido constituíram um importante avanço na micobacteriologia (93).

O aparecimento de sistemas automatizados e semi-automatizados de leitura do crescimento das micobactérias criaram um importante avanço na micobacteriologia. Estes sistemas permitem uma deteção mais precoce do crescimento utilizando diferentes métodos: (1) radiométrico (libertação de CO₂ marcado por Carbono 14, no Bactec 460TB®), (2) fluorimétrico (libertação de um composto fluorescente devido ao consumo de O₂, no MGIT® e no Bactec MGIT 960®), (3) colorimétrico (baseado na aquisição de cor por parte do meio de cultura, através de uma reação de redução secundária ao consumo de O₂ pelo MT, no MB Redox®), (94).

Sendo assim, consegue-se obter uma cultura positiva entre 5 a 15 dias, sendo os meios mais indicados para a deteção de novos casos. Porém, os meios líquidos não permitem a quantificação do crescimento das micobactérias e são particularmente propícios à contaminação por outras bactérias. Para aperfeiçoar a especificidade pode ser utilizada concomitantemente a cultura em meio sólido (79).

5.5 EXAMES IMUNOQUÍMICOS

Exames imunológicos encontrados para diagnóstico de TB atualmente são os ensaios de liberação de citocina e o teste tuberculínico. Segundo AMERICAN THORACIC SOCIETY, (2017) o teste cutâneo de tuberculina (TST) deteta imunidade mediada por células ao Mtb através de uma reação de hipersensibilidade do tipo retardado usando um precipitado de proteína de bacilos da tuberculina inativados pelo calor (purificado derivado de proteína (PPD)-tuberculina). O TST tem sido o método padrão de diagnóstico de LTBI (infecção de tuberculose latente),(95).

O TT é administrado pela injeção intradérmica de 0,1 mL de PPD (5 TU) na superfície volar do antebraço (método de Mantoux). Aparecerá uma pequena vermelhidão ou inchaço transitório. O teste é interpretado em 48-72 horas medindo o diâmetro transversal do endurecimento palpável. A interpretação do TT é estratificada pelo risco (96). Não pode induzir reatividade a administração repetida de TTs; Porém, uma repetição do TT pode restaurar a reatividade em pessoas cuja reatividade do TT diminuiu com o tempo. Por causa deste "fenômeno de reforço", o teste inicial de repetição é recomendado para pessoas com um TT negativo que serão submetidas a triagem periódica de TST e pessoas que não tenham feito teste de tuberculina recentemente (por exemplo, 1 ano). Este teste de "2 etapas", com uma repetição do TT dentro de 1–3 semanas após um TST negativo inicial, tem como objetivo evitar a classificação incorreta de TTs positivos subsequentes como uma conversão de TT, indicando infecção recente, quando na verdade são resultado de reforço.

5.6 EXAME DE BIOLOGIA MOLECULAR: TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Uma melhoria dramática na detecção e identificação direta de *M. tuberculosis* resultou de métodos que usam técnicas de amplificação de ácido nucleico. Os Testes de TAAN, dos quais o mais usado é a PCR, são testes de detecção rápida, que permitem uma resposta em 24 a 48 horas e são específicos para o MT- complex (97). Há vários kits de TAAN comercializados, cada um deles utilizando um método diferente para amplificar regiões específicas dos ácidos nucleicos. Os TAAN requerem um laboratório com equipamento específico e técnicos experientes, o que com que o procedimento encarece, sendo cerca de 14 vezes mais caro que um exame direto. A sensibilidade e a

especificidade dos TAAN têm sido bastante estudadas, tendo-se observado divergências de resultados (98).

O ensaio Xpert MTB / RIF é uma plataforma totalmente automatizada que usa reações em cadeia da polimerase em tempo real para detetar simultaneamente a presença de *M. tuberculosis* e resistência RIF (mutações no gene *rpoB*). Tem uma alta sensibilidade (estimativa combinada, 95%-96%) em amostras de escarro com esfregaço positivo usando cultura como um padrão de referência, mas uma sensibilidade moderada (estimativa combinada, 55%-62%) em amostras de escarro com esfregaço negativo (52). A grande maioria dos estudos aponta para uma especificidade muito alta no diagnóstico da TB pulmonar e extrapulmonar (99). Os TAAN podem dar resultados positivos em amostras com menos de 10 bacilos (79). Alguns estudos têm mostrado elevadas sensibilidades e com valores sobreponíveis, independentemente da amostra colhida ser pulmonares ou extrapulmonares (100).

Entretanto, alguns estudos mais recentes têm sugerido que uma nova técnica, o PCR em tempo real, baseada na determinação seriada quantitativa do DNA do MT e na avaliação do seu perfil evolutivo, ao longo do tempo, poderá ser útil na monitorização da resposta ao tratamento e na avaliação do curso da TB (101). Assim, segundo TAKAHASHI T. *et al.*, (2008) o PCR em tempo real, apesar de não avaliar diretamente a viabilidade das bactérias, ao analisar o perfil evolutivo da quantidade de DNA do MT no decorrer do tratamento antibacilar, permite perceber acerca de uma resposta favorável ou desfavorável à terapêutica (101).

6 REVISÃO DE LITERATURA

Método de coloração bacilar: Técnica de Ziehl-Neelsen e suas modificações

6.1 INTRODUÇÃO

As técnicas de coloração para o diagnóstico microscópico de TB não mudaram desde o desenvolvimento da coloração ácido-resistente para micobactérias por Franz Ziehl e Friedrich Neelsen (85). Esta técnica é baseada na composição e estrutura únicas da parede celular micobacteriana, que não libera os corantes presos entre a parede e a membrana, mesmo após o tratamento com ácidos fortes. No entanto, este método tem várias desvantagens. A coloração de ZN não é específica para micobactérias, ela também cora *Nocardia*, *Esquistossomos* e *Criptosporídios* (102,103) nem de sensibilidade suficiente. Numerosas amostras microbiológicas e histopatológicas positivas para micobactérias por cultura e / ou PCR não pode ser corado com ZNT (104) Isso ocorre principalmente por duas razões: (i) a ZNT tem um limite de detecção de 10^4 micobactérias por lâmina ou por ml (102,103), (ii) várias amostras histopatológicas e microbiológicas são negativas pela coloração de ZN, apesar do fato de que micobactérias podem ser cultivadas a partir dessas espécimes de tecido (105) ou micobactérias podem ser transmitidos a partir desses pacientes. Portanto, a ZNT não consegue detectar micobactérias de forma confiável durante todos os estágios da infecção, e a falha parece ser devido à modificação da parede celular externa em micobactérias persistentes (105).

6.2 DESENVOLVIMENTO TEÓRICO

6.2.1 A perspectiva histórica

No século 19, na Alemanha Oriental, o médico e cientista Robert Koch (1843 a 1910) estabeleceu técnicas bacterianas para diagnosticar infecções bacterianas. Em 1882, Robert Koch apresentou sua palestra marcante com uma declaração sobre a tuberculose: "Se a importância de uma doença para a humanidade é medida pelo número de mortes que causa, então tuberculose deve ser considerada muito mais importante do que os mais temidos doenças infecciosas, pragas, cólera e semelhantes. Um em cada sete seres humanos morre de tuberculose. Se considerarmos apenas os grupos produtivos de meia-

idade, a tuberculose leva embora um terço, e muitas vezes mais ". Ele demonstrou a presença da bactéria em forma de bastonete, *M. tuberculosis*, pelos métodos de coloração inventados por ele.

Ele usou várias adaptações dos métodos de coloração de Carl Weigert na baciloscopia. Após a descoberta de Robert Koch, vários outros pesquisadores (Ehrlich, Ziehl, Rindfleisch e Neelsen), com a intenção de melhorar o método de Koch, introduziram modificações nos reagentes e usaram ácido carbólico (fenol) como mordente. Paul Ehrlich desenvolveu a coloração de hematoxilina de alúmen e demonstrou o tubérculo bacilo em 1886. O método de Ehrlich foi ainda modificado primeiro pelo bacteriologista alemão Franz Ziehl (1859-1926), que modificou o procedimento usando ácido carbólico (fenol) como mordente. Posteriormente, o patologista Friedrich Neelsen (1854-1898) manteve o mordente de Ziehl, mas mudou a coloração primária para a fucsina básica (usada pela primeira vez por Ehrlich em 1882). Este método tornou-se conhecido como o ZNT no início até meados da década de 1890 foi uma coloração bacteriológica especial usada para identificar os organismos ácido-resistentes, principalmente micobactérias (85).

Neste método, o calor é usado para ajudar o corante entre para as paredes celulares cerosas dessas células difíceis de corar. O uso de calor neste método tem sido a razão pela qual esta técnica é chamada de método de "coloração a quente". A ZNT resistiu como uma forma confiável e eficaz de demonstrar as bactérias álcool-ácido resistentes (85). Simultaneamente, na Dinamarca, Hans Christian Gram desenvolveu um método para distinguir amplamente as bactérias em dois grupos com base em uma coloração particular característica. No entanto, as micobactérias são gram positivas, mas muitas espécies apresentam coloração fraca, mesmo após aquecimento prolongado. Em 1915, Kinyoun publicou um método que se tornou conhecido como método de "coloração a frio" porque a etapa do aquecimento foi removida em favor do uso de uma concentração mais alta do corante primário de fucsina fenicada (85).

De regra os processos tintoriais empregados tinham destino comum-corar bacilos álcool-ácido resistentes e, tradicionalmente, como na própria terapêutica, a coloração do bacilo de Hansen veio na esteira dos procedimentos empregados na identificação baciloscópica do *M. tuberculosis*. No entanto, há diferenças no comportamento tintorial entre o *M. leprae*

e as demais micobactérias. De modo geral, o bacilo de Hansen assume todos os corantes mais rapidamente que o bacilo de Koch, assim como é mais sensível à descoloração.

6.2.2 Método GASMoC

O Método GASMoC, é a técnica de Ziehl-Neelsen modificado onde elimina o uso de fenol e usa fucsina básica aquosa a 37 ° C para corar BAAR (106). Dados demonstram que a detecção de BAAR não requer fenol e que o método GASMoC pode substituir a ZNT e o Método Kinyoun em laboratórios de patologia. Estudos de DELLA & FAIL (2000) e McCOLLOUGH (2008) apontam que o fenol pode ser suprimido da técnica de ZN. Da mesma forma, McCOLLOUGH (2008) mostrou que fucsina básica aquosa aquecida cora *M. avium* e outros patógenos ácido-resistentes de peixes e invertebrados marinhos (90). Além disso, DELLA e FAIL (2000) demonstraram que é possível detectar *M. avium* em amostras humanas (89). Juntos, esses dados indicam que fucsina básica é útil na demonstração de vários tipos de micobactérias.

A semelhante capacidade de detecção de BAAR pelo método GASMoC e técnica de ZN, indica que o fenol não é necessário para a fucsina básica entrar na parede celular da bactéria como se acreditava até agora. De fato, o método inicialmente mencionado por Koch não usa este composto, mas sim uma solução alcoólica de azul de metileno e 10% de potássio hidróxido aquecido a 40 ° C (90). Em 1946, foi proposta uma teoria sobre o mecanismo de ação do FC, segundo a qual o fenol torna o corante aquoso mais lipofílico e, assim, permite sua união com os lipídeos (99). Além disso, acredita-se que a fucsina, uma vez dentro da parede celular, se associa com os ácidos micólicos e a hidrofobicidade resultante impede sua remoção da solução de diferenciação (97). Considerando que a interação da fucsina com os ácidos micólicos ocorre na ausência de fenol (98), em concordância com os resultados de (106), propuseram que o aumento da temperatura é suficiente para induzir a permeabilidade da parede micobacteriana pela quebra da porção lipídica e, assim, permitir a entrada do corante. Esta sugestão suporta a teoria inicialmente proposta por Lamanna (99) que afirmava que o fenol atua tornando o corante lipossolúvel sem interferir com a reação química (84).

Para o estudo do método GASMoC a amostra utilizada foram um total de 21 amostras de tecido: 13 casos eram de tecido humano com análise de diagnóstico confirmou a presença de bacilos nos tecidos, 7 de tecido humano não patológico

(negativo para a presença de BAAR - controle negativo) e 1 de tecido zebrafish positivo para BAAR (*M. marinum* - controle positivo), (106).

O resultado do estudo mostra que os dois avaliadores concordaram em 92,3% dos casos, uma vez que 12 dos 13 casos com diagnóstico prévio de TB obtiveram o mesmo resultado e dos 19 casos avaliados (12 TB + e 7 TB -), 11 foram positivos para a presença de *M. tuberculosis* com o ZNT (57,9%) em oposição a 12 casos positivos com o método GASMoC, usando BAAR (63,2%). Das amostras TB +, o método GASMoC apresentou bacilos em 12 (100%), ao contrário do ZNT que apenas identificou 11 (92,3%). Ao analisar os controles negativos, foi possível observar que todos estavam negativos com a técnica de ZN e método de GASMoC (106).

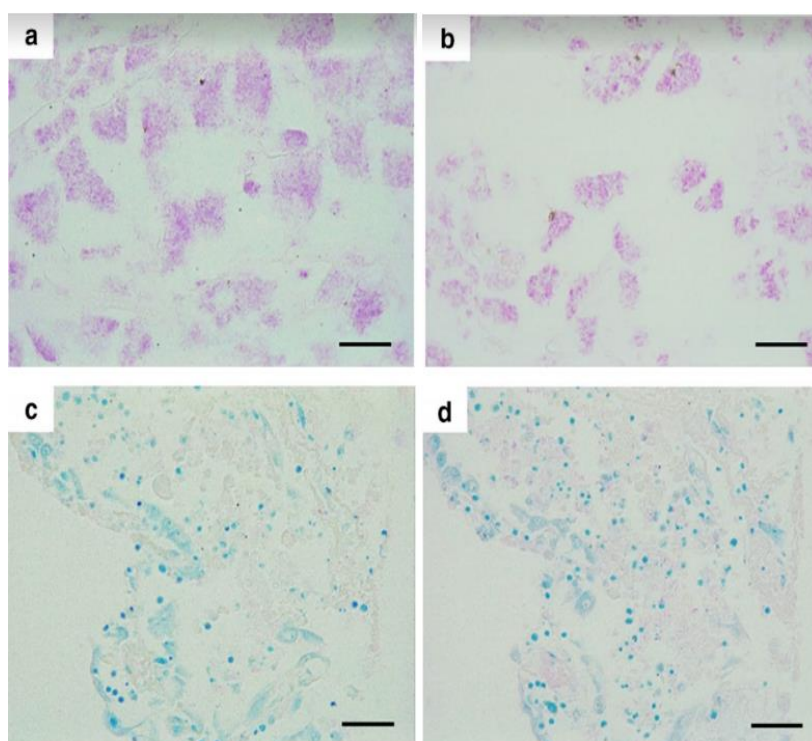


Figura 6.1 Bacilos álcool ácido resistente corados com a técnica convencional de Ziehl-Neelsen (a,c) e o método GASMoC (b,d) em amostras de tecido extrapulmonar prévio de tuberculose.

Fonte: (106)

Em conclusão o estudo do destaca a eficiência do método GASMoC na detecção de micobactérias patogênicas em amostras humanas, fazendo assim uma contribuição valiosa de ponto de vista clínica.

6.3 PROCEDIMENTO PARA MELHORAR A SENSIBILIDADE DO MÉTODO ZIEHL-NEELSEN

6.3.1 Processamento de amostra

Além da colheita adequada de amostras de expectoração do paciente suspeito com tuberculose pulmonar, a preparação de esfregaços bons, uniformes e finos e a coloração de esfregaços com reagentes de coloração de alta qualidade são essenciais para relatórios precisos na microscopia.

O processamento das amostras por centrifugação geralmente leva a um maior rendimento pela concentração dos bacilos. Em uma revisão sobre métodos de processamento de expectoração, 14 estudos (cultura usada como padrão de referência) investigaram o impacto do processamento de expectoração por centrifugação geralmente em microscopia. As taxas de recuperação não foram significativamente menores ao usar um RCF de 2.074 x g por 20 min, que está dentro da faixa da velocidade normalmente recomendada. Esta força aplicada por 10 min produziu uma baixa recuperação de organismos que não são adequados para concentrar micobactérias em amostras clínicas. Mais de 75% das micobactérias semeadas podem ser recuperadas no sedimento com um RCF de 3.000 a 4.000 x g por 15 a 20 min (107).

Além disso, um produto químico foi usado, como agente clareador ou hidróxido de sódio. O processamento da expectoração resultou em um aumento médio de 18% na sensibilidade em comparação com o esfregaço direto (108). Em um desses estudos, a sensibilidade dos esfregaços de BAAR aumentou de 28,6% usando o método direto para 71,4% (HS-SH) e 66,7% (NALC-NaOH) usando métodos DC. Ambas as técnicas de concentração foram altamente comparáveis para o esfregaço de BAAR em comparação com o esfregaço direto não concentrado. Um estudo raro, no entanto, encontrou sensibilidades dos métodos de concentração de NALC-NaOH direto e semelhantes (109).

Foi relatado que o processamento de bleaching facilita a identificação de bacilos, fornecendo um campo de microscopia mais claro por meio da digestão de muco e resíduos e da concentração de bacilos por meio de centrifugação ou sedimentação.

Alguns estudos descobriram que a sedimentação com hipoclorito de sódio é barata, rápida, eficaz e um método simples para melhorar o rendimento da baciloscopia (110).

Em um desses estudos em um ambiente de alta prevalência de HIV, a microscopia de sedimentação com hipoclorito de sódio detetou significativamente mais casos positivos do que a microscopia direta de esfregaço, 26,7% contra 21,7%, respectivamente (110). Embora o alvejante método tem sido usado rotineiramente apenas em três países, os estudos sugerem a avaliação e introdução do método de clareamento em locais onde a cultura de micobactérias não é realizada rotineiramente (111).

Além disso, Stop TB Partnership Retooling Task Force também identificou a sedimentação com hipoclorito de sódio como uma das três abordagens promissoras para melhorar a sensibilidade da baciloscopia de expetoração, especialmente em países de alta carga. Os estudos de sedimentação investigaram o efeito de sedimentação durante a noite ou curto tempo de sedimentação de 30- 45 min com sulfato de amônio, com cultura como o padrão ouro de referência (112).

O aumento médio na sensibilidade é de 23% usando sedimentação durante a noite, enquanto em estudos com tempos de sedimentação curtos, o aumento médio foi mais modesto em 9%. A especificidade foi comparável à microscopia direta de escarro (108). No entanto, a questão que permanece sem resposta é se os métodos acima mencionados produzirão resultados semelhantes se realizados em laboratórios periféricos em países de baixa renda? As preocupações evidentes são: viabilidade de centrifugação com fornecimento irregular de energia, recursos limitados; custo adicional de produtos químicos, treinamento inadequado e riscos biológicos potenciais apresentados.

A quitina também foi testada para uma melhor recuperação do MTB por digestão e sedimentação da mucosa. Moléculas de quitina assemelham-se muito à celulose e a N-acetil-L-cisteína e a quitina possui um grupo acetilamina em sua estrutura. Como o NHCO – CH₃ é responsável pelo efeito mucolítico da cisteína, a quitina pode induzir o mesmo efeito na expetoração. Em um estudo pioneiro, 16%, 15,1% e 14% das amostras foram encontradas positivo para MTB por concentração de N-acetil-L-cisteína, tratamento com quitina e métodos de liquefação de NaOCl, respectivamente, em comparação com MTB detetado por microscopia direta de expetoração (9,5%), (113). O efeito do aumento de RCF na sensibilidade do esfregaço de BAAR também foi determinado comparando as

correlações de cultura-esfregaço de amostras clínicas processadas com um RCF de 3.800 xg durante um período de 3 anos com aqueles processados em um período anterior de 3 anos, quando um RCF de 2.000 xg foi usado para concentrar os espécimes (107).

Estudo de Wilkinson (1951) propõe tratamento prévio do esfregaço com peróxido de hidrogénio (H₂O₂) por 5 min para restituir o oxigénio extraído pela ação redutora das sultanas. Lavar em água corrente abundante e executar a ZNT clássica. Afirma o autor que tal tratamento melhora a positividade em pelo menos 68,4%,(114).

Tabela 6.1- Sensibilidade da baciloscopia após diversas técnicas de processamento de amostras.

Nome do investigador	Método usado	Percentagem de Sensibilidade	Ano
Steingart et al.	Sedimentação usando hipoclorito de sódio ou hidróxido de sódio; revisão	18%	2006
Ganoza et al.	Solução salina hipertónica - hidróxido de sódio	71.4%	2008
Ganoza <i>et al.</i>	N-acetil L-cisteína-hidróxido de sódio	66.7%	2008
Cattamanchi et al.	N-acetil L-cisteína-hidróxido de sódio	52%	2009
Bonnet et al.	3.5% Água sanitária caseira	26.7%	2008
Singhal et al.	Método de sulfato de fenol amônio (PhAS)	85.5%	2013
Farnia et al.	N-acetil L-cisteína-hidróxido de sódio	16.1%	2002
Farnia et al.	Tratamento de quitina	15.1%	2002
Farnia et al.	Liquefação de hipoclorito de sódio	14.7%	2002
Wilkinson	Peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	68,4%	1951

6.3.2 Concentrações de reagente

Diferentes concentrações de fucsina fenicada também foram tentadas para aumentar a sensibilidade do esfregaço. Em um desses estudos, a coloração de ZN foi

feita usando diferentes concentrações de carbol-fucsina como 1%, 0,3% (Tabela 6.2). A sensibilidade do teste foi comparável quando 1% e 0,3% de fucsina básica foi usada, no entanto, a sensibilidade foi reduzida significativamente usando 0,1%. Usando este reagente em menor concentração pode reduzir custos que podem ter implicações em grande escala. Portanto, esta concentração foi proposta pela OMS e IUATLD, embora as diretrizes RNTCP continuem a recomendar 1% (115).

Tabela 6.2 - Sensibilidade da baciloscopia com diferentes reagentes de coloração.

Nome do investigador	Reagente usado	Percentagem de Sensibilidade	Ano
Deun <i>et al.</i>	1% fucsina fenicada	83%	2005
Deun <i>et al.</i>	0,3% fucsina fenicada	78%	2005
Deun <i>et al.</i>	Kinyoun	78%	2005
Fenge <i>et al.</i>	Fucsina fenicada com 0,3% de TritonX-100	82,9%	2014

6.3.3 Modificações na microscopia

Diferentes alternativas microscópicas incluem microscopia fluorescente, coloração de Kinyoun e coloração modificada de carbol-fucsina. De acordo com uma revisão sistemática de 45 estudos importantes, microscopia fluorescente foi encontrada em uma média 10% mais sensível do que a microscopia convencional (95%) e quase 98% específico (116). No entanto, inicialmente a microscopia fluorescente não foi amplamente implementada devido ao alto custo, frequente queima de lâmpadas de vapor de mercúrio caras, necessidade de fornecimento contínuo de energia e necessidade de uma sala escura (116). O advento dos microscópios fluorescentes baseados em diodo emissor de luz (LED) superou essas deficiências e agora estão sendo cada vez mais usados. Em um estudo do Laboratório Nacional de Referência (NRL), New Delhi, a sensibilidade e especificidade da microscopia LED, fluorescência de vapor de mercúrio e microscopia de luz foram 83,1% e 82,4%, 78,5% e 87,5%, 81,6% e 83,5%, respectivamente. O tempo médio de leitura do LED foi três vezes mais rápido que o da ZNT (117).

Atualmente, o LED com base na coloração Auramine O substituiu o ZN convencional microscopia em 200 Centros de Microscopia Designados (DMC) de

faculdades de medicina que operam em colaboração com o Programa Nacional Revisado de Controle da Tuberculose da Índia (RNTCP) em 2012 (118). Métodos aprimorados de detecção de MTB também foram tentados no formato de imunofluorescência. Em um estudo, o anti-MTB o anticorpo foi usado como o anticorpo primário seguido pela proteína de ligação ao anticorpo (Proteína A) marcada com Tris (2,2-bipiridil) diclororutênio (II) hexa-hidratado (RuBpy) nanopartículas de sílica dopadas para gerar um sinal fluorescente para exame microscópico.

O uso de nanopartículas fluorescentes revela intensidade de sinal amplificado e maior foto estabilidade do que o uso direto de corante fluorescente convencional (119). Essas técnicas são detalhadas na Tabela 5.3.

Tabela 6.3 - Sensibilidade da baciloscopia com diversas variações microscópicas.

Nome do investigador	Tipo de microscópio	Percentagem de Sensibilidade	Ano
Bhalla <i>et al.</i>	Microscopia LED	83.1%	2013
Bhalla <i>et al.</i>	Microscopia de vapor de mercúrio	82.4%	2013
Bhalla <i>et al.</i>	Microscopia de Luz	78.5%	2013

6.3.4 Leitura de esfregaços

A forma e a qualidade da leitura do esfregaço têm um grande impacto no resultado da baciloscopia. Um estudo observacional prospetivo durante um período de 6 meses descobriu que o tempo médio de exame de rotina para lâmina de escarro foi 2 min 6 s (intervalo interquartil 1:30-2:30). O reexame as cegas de todas as lâminas por 10 minutos aumentou significativamente o número de esfregaços positivos de 82 para 116 e a detecção geral de casos de 28 para 48 pacientes. Assim, garantindo que os esfregaços sejam examinados durante a duração recomendada, pelo menos 5 minutos ou 100 campos pode ser uma maneira simples e de baixo custo de melhorar a detecção de casos (120).

6.4 ALGUMAS MODIFICAÇÕES DO MÉTODO ZIEHL-NEELSEN AO LONGO DO TEMPO SEGUNDO REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA DE SIQUEIRA *et al.* (1984), (121):

- Balthazard e col. (1907) afirmam ser eficiente a modificação feita por Hansen; corar com o método de Ziehl a quente por 5 min. Lavar. Descorar com ácido láctico a 5% em água destilada e, depois, submeter ao álcool absoluto até descoloração. Lavar. Corar o fundo com solução de azul-de-metileno aquosa (técnica descrita por Poiré e Carranza, 1925).
- Argañaraz (1927) recomenda corar a preparação com solução carbol de Ziehl por 6 min, descorar rapidamente com solução de ácido nítrico a 10%, e fez-se a coloração de contraste com solução aquosa de azul-de-metileno a 1%, por 10 segundos.
- Rudel (1928) afirma que a coloração adquire um aspeto luminoso quando a carbol-fucsina é diluída em 1:4 ou 1:2 em água.
- Wade (1928) afirma que a" melhor diluição para a carbol-fucsina é 10g em 100ml de álcool a 95% (concentração aproximadamente igual a 8,5%).
- Segundo Manalang (1937) a coloração deve ser procedida a frio, através do método de Culion, mantendo desta forma a carbol-fucsina por 7 a 8 min; diferindo ainda no processo de descoloração, onde é usada solução de ácido nítrico a 15%, por 20 a 30 segundos. Contrastando com azul de metileno de Loeffler diluído a 1:40.
- Em sua modificação Van Breuseghem (1937) mergulha a lâmina, previamente fixada pelo calor em carbol-fucsina, à temperatura ambiente, (variando de 23 a 26°C) durante 2h no mínimo. Lavar em água e descorar com álcool sulfúrico (9:1) durante 20 segundos. Tornar a lavar e contra corar com azul de metileno de Loeffler por 30 segundos. O autor afirma ser a coloração a frio mais eficiente, deixando o bacilo com uma cor mais viva e mais espesso.
- Ogden (1952) afirma conseguir 100% de positividade aquecendo a carbol-fucsina por 10 min incidindo a chama sobre o corante e não sob a lâmina como refere a literatura. Escorrer o corante sem lavar, descorar com solução de ácido clorídrico a 3% em. álcool 70 a 80% por 3 a 5 min, lavar em água corrente e fez-se a coloração de contraste com azul de metileno de Loeffler por 3 min.
- Martinez e Calero (1956) afirmam ser mais eficiente, sem que haja necessidade de aquecimento, a coloração tradicional pelo ZNT adicionando-se 2 gotas de propileno glicol para 15ml da solução de fucsina (fucsina-tensioativa).

- Rodhes-Jones (1959) relata melhor eficiência utilizando a ZNT por imersão (em jarra de Coplin) e a temperatura ambiente por 20 min. Após lavagem em água corrente, o material é descorado com ácido sulfúrico a 5% por 5 min (também por imersão). Procede-se nova lavagem, de seguida fez-se a coloração de contraste com solução de azul toluidina a 0,1% por um min.
- Davison (1960) contesta Rhodes-Jones (1959) alertando para o perigo de uma descoloração inadequada pela utilização do ácido sozinho, por certo período de tempo. Indica a coloração a quente por 10 min e descoloração com uma solução a 3% de ácido clorídrico em álcool a 95°GL, por 15 min, e fez-se a coloração de contraste com azul de metileno.
- Chasles (1962) recomenda a utilização de substâncias tensoativas ZNT modificado. Cobrir o esfregaço com solução de carbol-fucsina adicionada de 15 gotas de Tween 80 ou Terpol para cada 100ml, por 10 min, a temperatura ambiente. Lavar e cobrir a lâmina com uma solução de álcool absoluto, ácido sulfúrico concentrado e solução de azul de metileno a 1%, nas respetivas proporções 4:1:7, por um minuto, lavar e secar ao ar.
- Padma (1963), após investigação das modificações propostas por Rhodes-Jones (1959) e Davison (1960), propõe a seguinte alteração da ZNT: corar com carbol-fucsina à temperatura ambiente por 20 min, lavar rapidamente em água, descorar com solução de ácido clorídrico a 3% em álcool a 95°GL, por 5 min. Lavar e fez-se a coloração de contraste com azul de metileno em solução aquosa a 1%, por um minuto.
- Wheeler e Draper (1980) sugerem modificação da fase de contra coloração com objetivo de melhor visualizar partículas de tecidos, contrastando melhor com as bactérias ácido-resistentes. Utiliza solução aquosa de azul solúvel (CI n.º 42.755) a 1%, por 5 min ou a 0,05%, por 10 min.

Sabe-se que existem diferenças no comportamento tintorial entre o *Mycobacterium leprae* e as demais micobactérias. De modo geral, o bacilo de Hansen assume todos os corantes mais rapidamente que o bacilo de Koch, assim como é mais sensível à descoloração. Estas diferenças têm suportado tentativas de se estabelecer técnicas que objetivam diferenciar as duas principais micobactérias. Posto isso, apoia-se assim, o progredir

contínuo de investigações nesta área, de modo a oferecer-se aos profissionais, processos simples e efetivos de identificação laboratorial das micobactérias.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

O estudo baseou-se na realização de testes de coloração para determinar a capacidade de deteção de *M. bovis* BCG pelo método GASMoC em amostra de urina em paralelo com a ZNT, onde uma total de 32 esfregaços preparados, tecido de zebrafish positivo para BAAR (*M. marinum* - controle positivo) e suspensão 3.7 na escala de McFarland (*M. bovis* BCG - controlo positivo).

7.2 LOCAL DO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

Este estudo foi realizado no laboratório de microbiologia do Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, em Lisboa, de infraestruturas e equipamentos, segurança microbiológica nível 2, além do facto de que inclui um especialista com um grau de diretora do laboratório de microbiologia (avaliadora dos esfregaços desta investigação).

7.3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Recipientes de resíduos
- Lâminas de microscópio, novas e limpas
- Lamelas,

- Lápis para rotular slides
- Tocha
- Pipetas de transferência estéreis com volume de marcação de graduações (embaladas individualmente)
- Micropipeta (Modelo: Micropipeta Monocanal Olen, Marca: Marca: KASVI)
- Pontas de micropipetas
- Tubos Eppendorf (Eppendorf Tubes ® 3810X)
- Centrifugadora (Modelo: Hettich EBA 200, Marca: Hettich Andreas)
- Camara de Fluxo laminar; (Modelo: Bio II Advance 3, Marca: Telstar)
- Microscópio ótico binocular acromático (Marca: Quirumed)
- Estufa bacteriológica e de cultivo (Marca: Incubig)

7.4 REAGENTES UTILIZADOS

- Fucsina básica 1% (Merck EUA)
- Carbol-Fucsina (Modelo: AppliChem ITW Reagents, Marca: PanReac)
- Azul Metileno 5% (Marca: Merck, EUA)
- Álcool-ácido (1 mL ácido clorídrico 37% em 99 mL etanol 70%)
- Álcool a 100%,
- Álcool a 70%
- Xilol

7.5 PROTOCOLOS UTILIZADOS

7.5.1 Inoculação da suspensão bacteriana

De acordo com as literaturas (122), (123) para a técnica de inoculação da suspensão bacteriana procedeu-se do seguinte modo:

Transfere-se 100 µl de suspensão para o eppendorf rotulado com “1:10”, contendo 900 µl de urina, e misturou-se bem, em seguida retirou-se 100 µl da solução do eppendorf “1:10” para o eppendorf “1:100”, que tem 900 µl de urina. Posteriormente centrifugar por 15 min a 4500 rpm (124). E por fim fez-se a preparação do esfregaço.

7.5.2 Preparação de esfregaço

Retirou-se 100µl do inoculo e transferiu-se para o centro da lâmina e fez-se no total de 6 lâminas duas para cada amostra, duas amostras controlo (suspensão bacteriana 3.7), duas amostras com diluição 1:10 e duas amostras com diluição 1:100, onde deixou-se secar os esfregaços ao ar livre durante 2h30. Posteriormente fixou-se o esfregaço passando 3 vezes pela chama da tocha.

7.5.3 Coloração do esfregaço - Técnica de Ziehl-Neelsen

Colocou-se as lâminas sobre um suporte, com a parte do esfregaço voltada para cima, cobriu-se as lâminas na totalidade com fucsina fenicada a 0.3%. Aqueceu-se as lâminas lentamente até a emissão de vapor e deixou-se arrefecer durante 15 minutos de seguida lavou-se as lâminas com água corrente. Depois cobriu-se as lâminas com a solução álcool-ácido 25%, deixou-se atuar durante 2 minutos e lavou-se em água corrente da torneira. Fez-se a coloração de contraste com azul de metileno a 5% (Merck, EUA) e deixou-se atuar durante 4 minutos. E por fim lavou-se com água corrente e secar ao ar livre.

7.5.4 Coloração do esfregaço – Método GASMoC

Incubaram-se as lâminas por 15 min a 37 ° C solução aquosa de fucsina básica a 1%: 1g de fucsina básica (Merck, EUA) e 100 ml de água destilada. Lavou-se em água corrente da torneira de seguida diferenciou com álcool-ácido (ácido clorídrico 1% em etanol 70%) até que a solução ficou incolor e lavou-se em água corrente da torneira, três vezes durante 2 minutos cada em cada lavagem. Fez-se a coloração de contraste com azul de

metileno a 5%, por 15s: 5g de azul de metileno (Merck, EUA), 100 ml de água destilada. Posteriormente, desidrataram em álcoois graduados, limpa-se em xilol e aplicou-se uma lamela usando um meio de montagem resinoso.

7.6 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO GASMOC

Para a otimização da técnica em estudo foi com intuito de aumentar a sensibilidade do método para a amostra de urina. Um total de 138 esfregaço foi analisado e 6 controlos foram analisados (3 tecido zebrafish BAAR+) e (3 suspensão bacteriana 3.7 na escala de McFarland). A otimização referida para amostra de urina foi efetuada com as variáveis descritos nas seguintes tabelas:

Tabela 7.1 Diferentes concentrações de Fucsina básica

Reagente	Concentração	Temperatura
Fucsina básica	2%	37 °C
Fucsina básica	4%	37 °C
Fucsina básica	6%	37 °C

Tabela 7.2 Diferentes tipos de diferenciadores (solução álcool-acido).

Solução álcool-ácido	Concentração %
Ácido clorídrico + álcool 70%	1%
	0,5%
Ácido sulfúrico + Álcool 70%	25%
	10%
Ácido Nítrico + Álcool 70%	5%
	1%
Ácido fosfórico + Álcool 70%	10%
	5%
Ácido acético + Álcool 70%	10%

	5%
Ácido Bórico + Álcool 70%	5%
	2%
Álcool 70%	70%

Através dos protocolos aplicados de diferentes estudos, aplicou-se os mesmos tipos de diferenciadores e concentração (121), para segunda concentração foi escolhida uma concentração menor a que do estudo, optou-se ainda por escolher os ácidos de acordo com a sua classificação de força (ácidos fortes, moderados e fracos) com intuito de obter uma maior margem de classificação no estudo com diferentes resultados.

Na ZNT e no método GASMoC, os BAAR são corados de rosa a vermelho e os componentes do tecido da amostra são corados a azul. Uma patologista Clínica avaliou um total de 180 lâminas microscopicamente (16 para ZNT, 16 para o método GASMoC, 138 na otimização do método GASMoC e 10 controlos) dos casos bacilos-positivos, classificando cada lamina como "positiva" - indicando a presença de BAAR - ou "negativa" - indicando a ausência de BAAR em todo o esfregaço.

Este critério é baseado nas recomendações mais recentes da OMS para avaliação de rotina de amostras enviadas para a ZNT (125) e nos estudos de DELLA e FAIL (2000) e MCCOLLOUGH (2008). Além do critério mencionado, fizeram observações sobre a intensidade da coloração de AFB (comparando o par de lâminas pertencentes a cada técnica e método) e a concentração das bactérias a cada diluição.

7.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram interpretados usando o software IBM SPSS®, Excel e os resultados estatísticos foram obtidos através do McNemar's Teste do Qui quadrado (valor P = 0,05).

7.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O agente etiológico *M. bovis* BCG utilizado neste estudo foi gentilmente fornecida pelo INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P., e a amostra biológica utilizada (a urina) foram fornecidas pela autora do estudo. A presente investigação foi registrada no Comitê de Ética da “Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa”.

8 RESULTADO

8.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para determinar se o método GASMoC (ZNT modificado que usa fucsina básica aquosa 1% aquecida a 37 ° C por 15 min) é ou não capaz de detetar micobactérias de forma semelhante ao da ZNT em amostras microbiológicas, um total de 32 esfregaços foram submetidos a ambas as técnicas e avaliadas por uma patologista clínica.

O resultado da avaliadora inicialmente para o primeiro ensaio foi classificado como “duvidoso” em 2 esfregaços com diluição 1:10 para o método de GASMoC, isso porque apresentava uma coloração ténue ou pouco corado. Com isso levou com que a avaliadora classifica como uma lâmina negativa. Dos 32 esfregaços avaliados, obteve (37,5%) de positividade para a presença de *M. bovis* BCG e (62,5%) de negatividade durante a avaliação. Para a ZNT 12 esfregaços testaram positivos (75%), onde desses 12 esfregaços, 8 com diluição 1:10 e 4 com diluição de 1:100 (Tabela 8.1, Fig. 8.1a e 8.1b) e para o método GASMoC não identificou nenhum esfregaço positivo.

Para o método GASMoC apresentou negativas para todos os esfregaços avaliados, ao contrário da técnica de ZN que apenas identificou 4 esfregaços negativos e desses 4 esfregaços todas é da diluição 1:100.

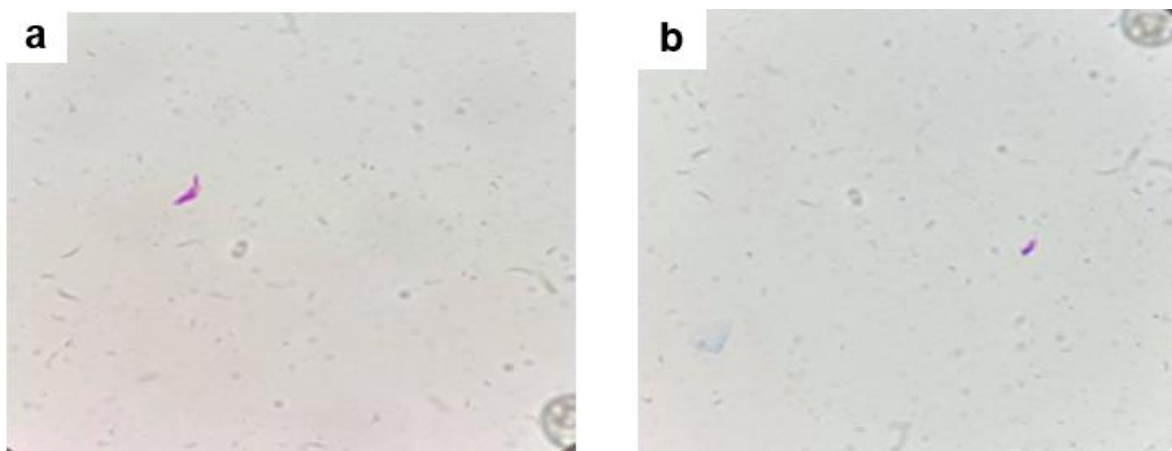


Figura 8.1 Bacilos álcool ácido resistentes corados com a técnica convencional de Ziehl-Neelsen (a,b) em amostras de urina com inoculação de *M. bovis* BCG diluição 1:10 (a), diluição 1:100 (b).

Fonte: Própria

Tabela 8.1 Resultados da coloração com a técnica de Ziehl-Neelsen e o método GASMoC.

Resultados	Técnica de Ziehl-Neelsen	Método GASMoC
Positivo*	12	0
Negativo*	4	16
Total	16	16

Positivo*- presença de bacilos álcool-ácido resistente; **Negativo***- ausência de bacilos álcool-ácido resistente.

O resultado entre as diluições mostra que a diluição 1:10 teve mais capacidade de detecção para ZNT, onde 8 esfregaços testaram positivos com a diluição 1:10 em comparação com a diluição 1:100 em que apenas 4 testaram positivos, afirmando que a maioria dos esfregaços que apresentaram resultados positivos foi os que tiveram maior concentração 1:10.

Tabela 8.2 Resultados de diferentes diluições para a técnica de Ziehl-Neelsen e o método GASMoC.

Diluição	Resultados		Total
	Positivo	Negativo	
1:10	8	8	16
1:100	6	10	16
Total	14	18	32

Foram analisados 2 tipos de controlo, tecido de zebrafish positivo para BAAR (*M. marinum* - controlo positivo) e suspensão 3.7 na escala de McFarland (*M. bovis* BCG - controlo positivo). Ao analisar os controlos dos dois métodos, foi possível observar que todos foram positivos tanto para a ZNT quanto para o método GASMoC. Isso só nos ajuda a justificar provando que a amostra de urina tem pouca sensibilidade perante o Método GASMoC.

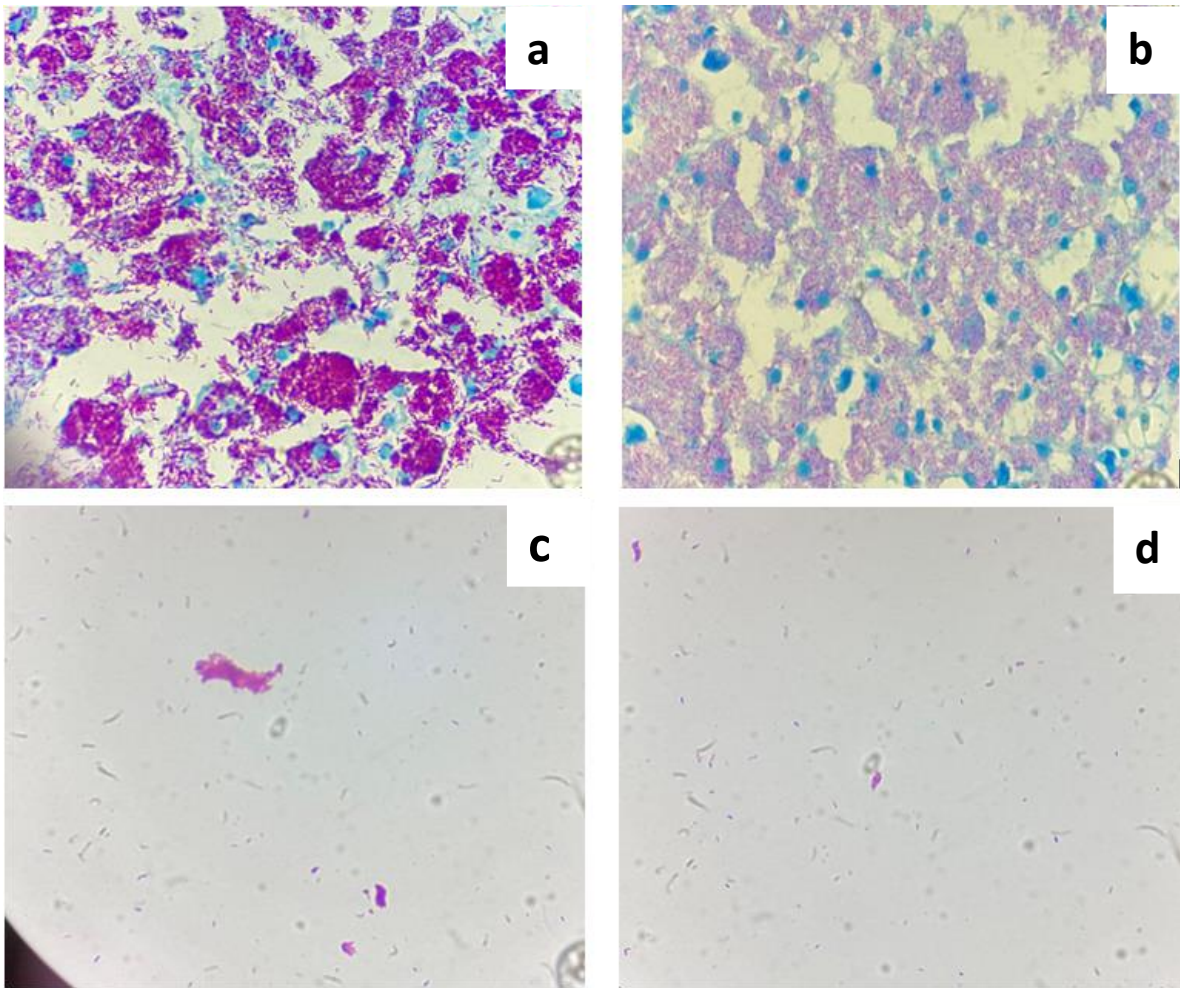


Figura 8.2 Bacilos álcool ácido resistente corados com a técnica convencional de Ziehl-Neelsen (**a**, **c**) e o método GASMoC (**b**, **d**) em controlos positivos. amostras de tecido extrapulmonar (**a**, **b**), suspensão bacteriana (**c**, **d**).

Fonte: Própria

Ao fazer esta análise dos resultados verificamos que o a ZNT obteve maior capacidade de deteção, onde teve com 12 casos positivos em contrapartida com o método GASMoC não apresentou nenhum caso positivo (figura 8.3).

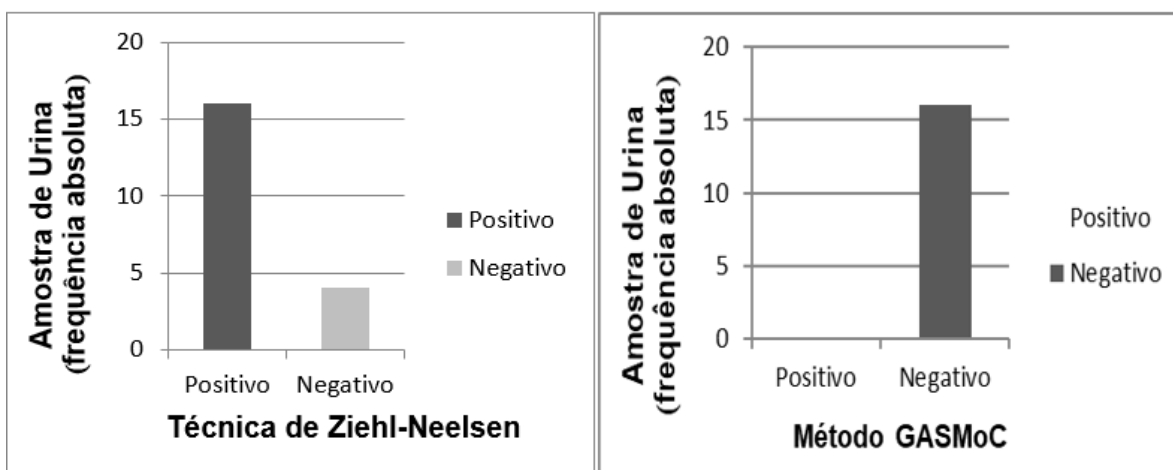


Figura 8.3 Detecção de *M. bovis* BCG pela técnica de Ziehl-Neelsen e método de GASMoC. Frequências absolutas das amostras de urina submetidas á técnica de Ziehl-Neelsen (a) e ao método GASMoC (b) avaliadas como positivas e negativas para BAAR. Um total de 32 esfregaços foram analisados.

Fonte: Própria

Para confirmar isso, as comparações entre as capacidades de detecção de ambas as técnicas foram realizadas aplicando o método de McNemar Teste do qui quadrado. O teste mostra que não houve diferença estatisticamente significativas entre os resultados discordantes do ZNT e do método GASMoC ou as distribuições dos diferentes métodos são iguais onde o valor do $P = 0,5$ ($P > 0,05$; teste Qui-quadrado de McNemar).

8.2 RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO GASMOC

Numa segunda abordagem, e para análise da otimização do método GASMoC, foi utilizado duas variáveis, a concentração da fucsina básica e a solução álcool-ácido. Para a variável concentração, foi analisado o método com concentrações de fucsina básica a 2%, a 4% e a 6%, a temperatura de 37 °C.

Ao fazer esta análise de alteração da concentração da fucsina básica verificamos que não houve resultados positivos na coloração, entretanto, houve algumas alterações em alguns parâmetros durante a coloração.

Tabela 8.3 Resultado da coloração com diferentes concentrações de fucsina básica observados no método GASMoC.

Fucsina básica	Resultados		Total
	Positivo	Negativo	
2%	0	30	30
4%	0	30	30
6%	0	30	30
1%	0	16	16
Total	0	106	106

Para resultados com a variável em estudo diferenciador (solução álcool-ácido), foram analisados 6 diferenciadores diferente, entre eles incluem ácidos fortes, ácidos moderados e ácidos fracos e o álcool a 70%, durante a coloração não apresentou nenhum caso positivo.

Tabela 8.4 Resultados da coloração com diferentes soluções álcool-ácidos observados no método GASMoC.

Solução álcool-ácido	Resultados		Total
	Positivo	Negativo	
Ácido clorídrico 1%	0	32	32
Ácido clorídrico 0,5%	0	12	12
Ácido nítrico 5%	0	12	12
Ácido nítrico 1%	0	12	12
Ácido sulfúrico 25%	0	12	12
Ácido sulfúrico 10%	0	12	12
Ácido fosfórico 10%	0	12	12
Ácido fosfórico 5%	0	12	12
Ácido acético 10%	0	12	12
Ácido acético 5%	0	12	12
Ácido bórico 5%	0	12	12
Ácido bórico 2%	0	12	12
Álcool 70%	0	6	6
Total	0	164	164

Os esfregaços corados com a fucsina básica 1% e 2% não apresentavam qualquer sinal de coloração após a etapa de descoloração com a solução álcool-ácido, enquanto que

para as concentrações 4% e 6% apresentaram colorações mais densas e com alguns diferenciadores como álcool 70% apresentavam o fundo do esfregaço todo de cor rosa (figuras 8.4).

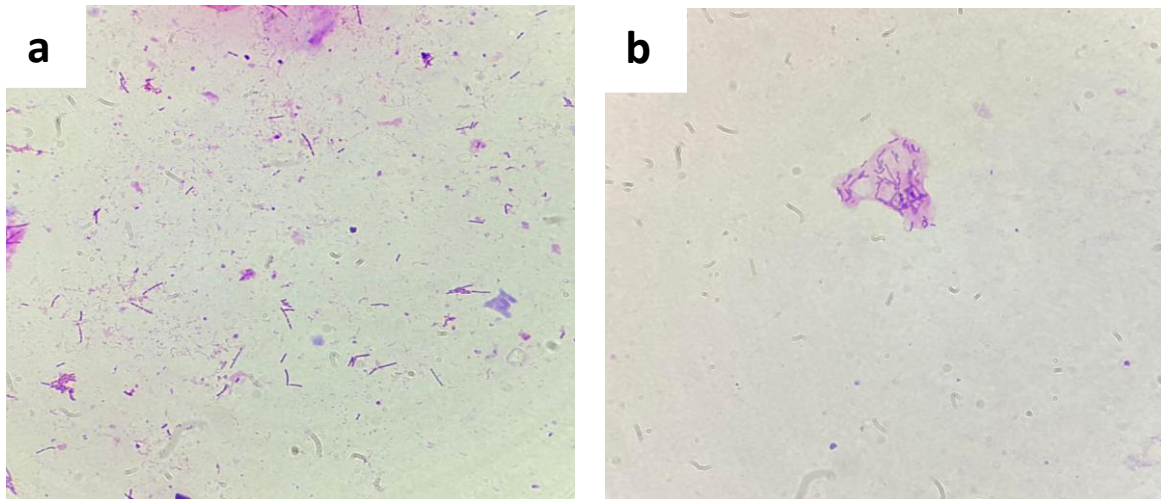


Figura 8.4 Bacilos álcool ácido resistentes corados com método GASMoC usando a solução de diferenciação álcool 70% e fucsina básica a 4% (a,b) em amostras de urina com inoculação de *M. bovis* BCG diluição 1:10 (a), diluição 1:100 (b).

Fonte: própria

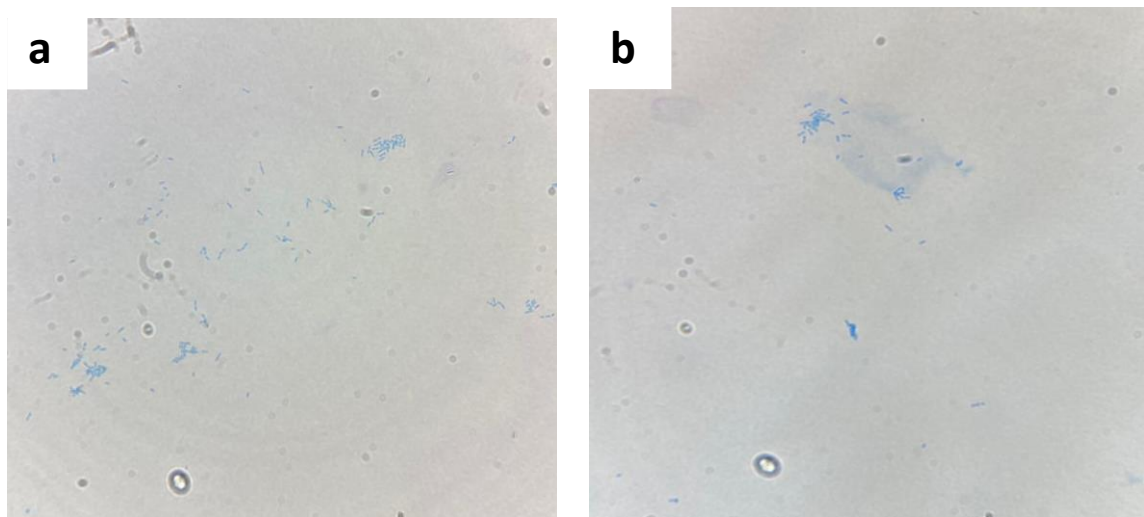


Figura 8.5 Bacilos álcool ácido resistentes corados com método GASMoC usando a solução de diferenciação ácido clorídrico 1% (a) e ácido sulfúrico 25% (b) e fucsina básica a 4% em amostras de urina com inoculação de *M. bovis* BCG diluição 1:10 (a), diluição 1:100 (b).

Fonte: própria

Os resultados das colorações durante a otimização do método apesar de apresentarem algumas alterações, o resultado manteve-se para ambas as diluições feitas, ou seja, tanto para diluições de 1:10 como para 1:100 os resultados foram negativos.

9 DISCUSSÃO

A tuberculose ainda é considerada um grande problema de saúde pública e estima-se que mais pessoas morram de tuberculose a cada ano do que em qualquer período anterior da história (12). O diagnóstico rápido e preciso é a principal etapa no controle da TB pulmonar. Em países de baixa renda, há uma necessidade especial de técnicas de diagnóstico simples e baratas. Apesar dos inúmeros avanços técnicos, a microscopia continua sendo a pedra angular do diagnóstico de TB, principalmente nos países em desenvolvimento.

A OMS recomenda o uso contínuo de microscopia de esfregaço para diagnóstico e tratamento monitoramento, mesmo em áreas atendidas por novas tecnologias como cultura de TB, ensaios Line Probe e o ensaio Gene Xpert.

O resultado deste estudo demonstra que o método GASMoC não tem a capacidade de detectar micobactérias na amostra de urina no exame direto, embora a técnica de ZN teve mais sensibilidade a amostra de urina, a técnica também demonstrou uma grande dificuldade leitura dos resultados. O objetivo desse estudo foi explorar o valor de diagnóstico de um método de detecção sem uso de fenol para micobactérias.

Para o caso do ensaio 1, foi considerado negativo para a presença de *M. bovis* BCG para o método de GASMoC, a avaliadora apontou que a fraca coloração dificultava a avaliação. Esta observação pode assim justificar a discordância entre o resultado positivo com a técnica de ZN.

Segundo ULUKANLIGIL, M. *et al.*, (2000), 17 amostras de urina foram utilizadas para pesquisa de bacilos álcool-acido resistente, mas nenhuma delas foi considerada positiva em esfregaços ou culturas coradas para ZNT (126). No estudo de MORTIER, E. *et al.*, (1996), BAAR em esfregaços direto corados com ZN foram detetados em apenas 8 das 19 amostras processadas. Podendo observar que nos dois estudos as amostras de urina

para o exame direto para coloração de ZN não apresentaram uma boa sensibilidade para o método (127).

O resultado negativo nos dois primeiros ensaios realizados para a diluição 1:100 com a ZNT, deve-se pelo facto de ser uma diluição maior fazendo com que diminua ainda mais a concentração da bactéria na amostra tornado mais difícil a sua deteção. Os esfregaços que da ZNT que testaram positivos, continham mais 5 bacilos álcool-acido resistente por campos. Entretanto, a ZNT demonstrou uma baixa sensibilidade perante a amostra de urina nas diluições 1:100, visto que a amostra de urina tem características que dificulta a técnica de coloração com por exemplo o seu aspeto físico (cor e densidade). Acredita-se que a amostra de urina límpida tem menos sensibilidade e menos especificidade do que amostras de urina com muco. Uma das principais razões para o fracasso de Programas de controle de TB, é a incapacidade de detetar casos infecciosos precocemente (128). Micobactérias são geralmente presente em número relativamente pequeno na maioria amostras clínicas incluindo urina.

Contudo, no presente estudo a coloração pelo método GASMoC teve uma coloração mais ténue em comparação com a ZNT. A baciloscopia da urina raramente é positiva, exceto quando há lesões extensas com grandes populações bacilares, e pode ocorrer resultado falso positivo (129). Bartlett, em 1974, propôs um esquema para a classificação da amostra com base no número relativo de células epiteliais escamosas, células inflamatórias e muco vistos no esfregaço de Gram, ele define que quanto mais background a amostra tiver maior é a chance de encontrar patógenos na coloração (130). Segundo o estudo de SALEH M.A *et al.* (2014) dois métodos foram usados para diagnóstico de tuberculose renal. O primeiro método usando coloração de ZN para deteção de *M. tuberculosis* onde a coloração de ZN foi negativa em todas as amostras de urina, (131) o resultado entra em concordância com o nosso resultado para o método de GASMoC.

O resultado da primeira experiência mostrou que o método de GASMoC não possui a mesma eficiência que a ZNT, entretanto, a este veio a ser otimizado para melhorar a sua capacidade. Nenhum estudo comparativo mostrando uma eficácia pelo menos equivalente da coloração de fucsina a 0,3% parece ter sido realizado antes de sua adoção nas diretrizes. A recomendação mais antiga encontrada para esta concentração mais baixa foi baseada em coloração mais sólida de BAAR com alguns tipos de fucsina básica, produzindo uma coloração granular em concentração mais alta (131).

Nosso estudo teve como objetivo avaliar o uso de um 2%, 4% e 6% de fucsina básica na coloração com o esfregaço aquecido uma vez por 15 min, seguindo o método GASMoC original, exceto para a concentração fucsina básica (cerca de 1% no método original). Para o método GASMoC, o tempo e a temperatura foram mantidos conforme prescrito no artigo original de GASMoC. Embora essa comparação não fosse o objetivo principal do estudo, mantivemos a temperatura á 37°C para o aquecimento da fucsina básica para esfregaços de rotina em 15 minutos, de acordo com o protocolo do projeto. De acordo com a edição anterior do guia IUATLD o aquecimento era aplicado apenas uma vez para esfregaços de rotina e de estudo.

Uma análise nas intensidades das colorações e considerando todos as diluições por todas as concentrações de fucsina básica estudada, mostraram que a técnica com concentração a 2% apresentou pouca intensidade na coloração, enquanto que as concentrações 4% e 6% apresentaram colorações mais intensas no esfregaço. Isso porque quando diferenciado com o álcool 70% os esfregaços corados com fucsina básica a 2% era completamente descorado e os esfregaços corados com a concentração 4% e 6% não. A técnica de 0,3% 5 min ZN apresentou mais falsos negativos e uma sensibilidade menor do que 1% 5 min ZN, sem atingir significância estatística. No entanto, a técnica Kinyoun rendeu significativamente mais falsos negativos do que 1% 5 min ZN (65 vs. 26), com uma diferença de sensibilidade altamente significativa (85,6% vs. 93,0%), (115). As mesmas amostras de expetoração foram examinadas rotineiramente, usando a mesma coloração com fucsina básica quente a 1% por 15 min, mas esses esfregaços não faziam parte do estudo e não foram verificados novamente em caso de discordância, então não puderam ser incluídos na análise principal (115).

Embora, os resultados das colorações de todas as concentrações de fucsina básica estudadas foram negativos para detecção de *M. bovis* BCG, os resultados das colorações entre eles são diferentes, onde para fucsina básica 2% os esfregaços visualizados não tinham qualquer tipo de coloração, independente do tipo de diferenciador utilizado para descoloração e para as duas outras concentrações (4% e 6%) os esfregaços apresentavam colorações diferentes de cordo com o tipo de diferenciador utilizado. Comparamos as sensibilidades de todos técnicas de coloração aplicadas isso gerou resultados ligeiramente diferentes, com uma superioridade surpreendentemente clara e altamente significativa da ZNT de rotina 1% 15 min, enquanto não houve diferença entre 0,3% 5 min ZN e Kinyoun (sensibilidade 78%). Com sensibilidade de 83%, o desempenho

da ZNT de 1% 5 min foi médio, mas foi significativamente melhor do que as duas técnicas anteriores (115). O presente estudo mostrou que maiores concentrações de fucsina básica podem deixar uma margem de erro muito pequena quando outros fatores são desfavoráveis.

No presente estudo as diferentes soluções de diferenciação apresentam resultados variados nos diferentes grupos dos ácidos e concordância com os resultados do estudo de GRADWOHLM RBH *et al.* (1980), mostra claramente que a diferenciação na técnica de coloração ácido-resistente é uma etapa crítica na eficiência desta metodologia (132).

A avaliação negativa dos esfregaços para detecção de *M. bovis* BCG pela diferenciação com álcool 70% foi causada pela coloração excessiva de fucsina no fundo do esfregaço, e este não foi removido adequadamente pelo álcool, fez com que as micobactérias apresentassem profundamente corados com a mesma cor do fundo. Isso também aconteceu com os esfregaços que usaram soluções de ácido bórico 5% e 2% para diferenciação apresentou fucsina excessiva no fundo do esfregaço o que indica que não foi removido corretamente credita-se que foi causada pela baixa concentração utilizada do ácido e também por ser do grupo dos ácidos fracos. Entretanto, as soluções de ácido sulfúrico e de ácido clorídrico apresentaram coloração de cor azul (Figura 8.5 a, b), os resultados mantem-se para as diferentes concentrações utilizadas (ácido clorídrico 1% e 0,5%, ácido sulfúrico 25% e 10% e ácido acético 10% e 5%). Acredita-se que a coloração azulada observada nos esfregaços foi causada pela solução de diferenciação utilizada por ser dos grupos dos ácidos fortes. Apresentou-se os mesmos resultados para o ácido fosfórico. Segundo ORTOLANI E. L. (2000) a baixa concentração dos ácidos faz com que o esfregaço apresenta um fundo com coloração excessiva de fucsina e as altas concentrações apresentam uma coloração levemente avermelhado (133). No estudo de ORTOLANI E.L. (2000) os resultados mostram que a menor contagem de oocistos pela diferenciação com solução de ácido sulfúrico a 0,25% foi causada pela impregnação excessiva de fucsina fenicada no fundo do esfregaço não removido adequadamente pela baixa concentração do ácido. Essa impregnação excessiva causou diagnósticos errados de muitos oocistos profundamente manchados com a mesma cor do fundo. Já os esfregaços descolorados com solução de ácido sulfúrico a 5% e 10% apresentaram oocisto levemente corado de vermelho (133).

Durante a observação de esfregaços descolorado com a solução de ácido clorídrico foi possível detetar fragmentos que indicam que foram resultantes de destruição das

micobactérias pelo ácido concentrado. Os fragmentos foram resultantes da ruptura dos organismos causada pela ação mordente da solução ácida concentrada. A destruição dos oocistos pelo ácido certamente reduziu a contagem dos bem corados (133). Acredita-se que o mesmo tenha acontecido com o nosso estudo. Normalmente, a ZNT usa ácido clorídrico em vez de ácido sulfúrico para diferenciar a coloração de carbol fucsina (132,134).

A otimização mostrou que mais estudos são necessários para comparar a eficiência dos ácidos em diferentes concentrações para diferenciar a coloração de fucsina básica na amostra de urina. A sensibilidade da técnica apresenta-se muito baixa neste estudo, porém acredita-se que o processamento da amostra de urina com a albumina teria uma grande importância no aumento da sensibilidade da técnica, sem descartar a preparação de bons esfregaços.

10 LIMITAÇÕES

Confirma-se que existem limitações nesse estudo. No que respeita à acessibilidade do laboratório, a disponibilidade do espaço foi proporcionada com limitações, assim como alguns equipamentos necessário para realização da experiência (estufa a 40° C), as amostras de estudo, devido ao período de pandemia em que encontrávamos e que ainda vivemos.

11 CONCLUSÃO

Nossa prioridade neste estudo foi encontrar um método rápido e econômico para o diagnóstico de TB. Concluímos que a ZNT é bastante econômica em termos de tempo e despesas. Embora existam várias metodologias para o diagnóstico da doença, o combate à tuberculose constitui ainda em um grande desafio no que se refere ao oferecimento de tecnologias em saúde pública de forma ampla e contundente.

Dependendo de suas características e particularidades, cada metodologia tradicional tem suas limitações, seja pelo custo, seja pela necessidade de profissionais

especializados, pelo tipo de amostras utilizados ou por questões de biossegurança. Apesar dos avanços no diagnóstico da doença, com a inclusão do teste rápido molecular como rotina, que permite identificação apenas de *M. tuberculosis*, os exames de baciloscopia e cultura continuam como padrão para monitoramento do tratamento e em situações de novas terapias, que demandam conhecer o perfil de resistência aos medicamentos, e a escolha do tratamento mais adequado.

Em países em desenvolvimento o uso de tecnologias de ponta é limitado e o combate às doenças como a tuberculose ainda é desafiador. Por contraste do enfrentamento às doenças negligenciadas, o acesso limitado agrava o problema e coloca a saúde pública em patamares que não contemplam o que se espera como redução de custos na abordagem diagnóstico e terapêutica e ganhos na qualidade de vida para as pessoas acometidas pela doença. Assim, o desenvolvimento e/ou uso de metodologias mais simples com GASMoC, de menor custo, aumentaria a possibilidade de realização de testes na rotina laboratorial de diferentes regiões e incentivaria as pesquisas dos pequenos investigadores em prol da investigação, favorecendo o combate à TB.

Os resultados desse estudo demonstram que o método GASMoC tem pouca sensibilidade em comparação com a ZNT na amostra de urina, e com isso acredita-se que a sensibilidade do método GASMoC varia com o tipo de amostra. Portanto, sugere-se que trabalho adicional deve ser realizado para confirmar esta hipótese. Os resultados desse estudo demonstram ainda que a ZNT é indicada para o diagnóstico de *M. bovis* BCG na amostra de urina.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson MC, Salfinger M, et al. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(2).
2. Jensen PA, Lambert LA, Iademarco MF, Ridzon R. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, 2005. Vol. 54, *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control.* 2005. 1–141 p.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly [Internet].* 2009;(58(1):7-10). Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5801a3.htm>
4. Public T, Services H. *Mycobacterium Tuberculosis : Assessing Your Laboratory.* Public Health. 1995;
5. Lewinsohn DM, Leonard MK, Lobue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, et al. Official American thoracic society/Infectious diseases society of America/Centers for disease control and prevention clinical practice guidelines: diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clin Infect Dis.* 2017;64(2):111–5.
6. Morris A, Reller LB, Salfinger M, Jackson K, Sievers A, Dwyer B. Mycobacteria in stool specimens: The nonvalue of smears for predicting culture results. *J Clin Microbiol.* 1993;31(5):1385–7.
7. Smear AB, Christenson RH, Ph D, Schell WA, Bledsoe MC, Emler JL, et al. Issues in Cerebrospinal Fluid Management. 1990;(337):418–23.
8. Hinman AR, Hughes JM, Berreth DA, Broome C V, Curran W, Hardy GE, et al. National action plan to combat multidrug-resistant tuberculosis. *MMWR Recomm Rep.* 1992;41(RR-11):5–48.
9. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Good RC. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? *J Clin Microbiol.* 1993;31(4):767–70.
10. Hobby GL, Holman AP, Iseman MD, Jones JM. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.*

- 1973;4(2):94–104.
11. Frieden T. Toman's Tuberculosis: Case Detection, Treatment, and Monitoring : Questions and answers. 2004. 51–61 p.
 12. World Health Organization RO for E. Tuberculosis in the WHO European Region. WHO Fact sheet [Internet]. 2017;45(March):2. Available from: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/334681/FS-WTBD.pdf?ua=1
 13. Pfaller MA. Application of new technology to the detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *Am J Clin Pathol.* 1994;101(3):329–37.
 14. Steingart KR, Ramsay A, Pai M. Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007;5(3):327–31.
 15. Larsson U. p = nt Tuberculostearic acid t (R) -lo-methyloctadecanoic-acid] is regarded a char- Extraction. (Ci).
 16. Moore DF, Curry JI. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):1028–31.
 17. Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ. Evaluation of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1994;32(2):393–7.
 18. Pandolfi JR, Malaspina AC, Santos ACB, Suffys PN, Oellemann MAC, Valentini SR, et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2007;28(3):251–7.
 19. Brock TD. Robert Koch: A Life in Medicine and Bacteriology. ASM Press, editor. 1998. 364 p.
 20. Santos CLS, Santos FC, Gomes Neto M, De Moraes LH, Nazaré M de A. Avaliação da capacidade funcional em pacientes com tuberculose pulmonar. *Fisioter Bras.* 2016;13(1):4–8.
 21. Ferreira AA de A, Queiroz KC de S, Torres KP, Ferreira MÂF, Accioly H, Alves M do SCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Rev Bras Epidemiol.* 2005;8(2):142–9.
 22. DE MELO ABRAHÃO RMC. TUBERCULOSE HUMANA CAUSADA PELO

Mycobacterium bovis: CONSIDERAÇÕES GERAIS E A IMPORTÂNCIA DOS RESERVATÓRIOS ANIMAIS. Arch Vet Sci. 1999;4(1).

23. FALLER, M., MURRAY, P., ROSENTHAL K. Microbiologia Médica. 6th ed. 2011.
24. Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KLMC, Drijfhout JW, D'Souza S, Necker A, et al. Identification of Major Epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* AG85B That Are Recognized by HLA-A*0201-Restricted CD8 + T Cells in HLA-Transgenic Mice and Humans . J Immunol. 2000;165(11):6463–71.
25. Forbes, Betty; Sahm, Daniel; Weissfeld A. Diagnostic Microbiology [Internet]. 12th ed. 2007. 200 p. Available from: <https://www.elsevier.com/books/study-guide-for-bailey-and-scotts-diagnostic-microbiology/forbes/978-0-323-04780-7>
26. Bergey, D.H., HOLT JG. Bergey's manual of determinative bacteriology. 19th ed. Baltimore : Williams & Wilkins, editor. 1994. 787 p.
27. Ratledge, Colin. Stanford J. The Biology of the Mycobacteria: Physiology, identification, and classification. ilustrada. Academic Press, editor. Universidade de Michigan; 1982. 544 p.
28. Santos MO. Micobactérias: identificação e perfil de sensibilidade a tuberculostáticos em amostras isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Maranhão. 2015;2–3.
29. Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. J Thorac Dis. 2014;6(3):210–20.
30. Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, Ängeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. Eur Respir J. 2013;42(6):1604–13.
31. Eisenstadt J, Hall GS. Microbiology and classification of mycobacteria. Clin Dermatol. 1995;13(3):197–206.
32. Doyle AW. Fundamental aspects of Mycobacterial identification. 2015;15–76.
33. Wildner LM, Nogueira CL, Souza S. MICOBACTÉRIAS : EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO. 2011;40(3):207–29.
34. Rossetti MLR, Valim AR de M, Silva MSN, Rodrigues VS. Tuberculose resistente: revisão molecular. Rev Saude Publica. 2002;36(4):525–32.
35. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. Problems in the standardization of the polymerase chain reaction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Rev Saude Publica. 1999;33(3):281–6.

36. Baddeley A, Dean A, Monica Dias H, Falzon D, Figueroa C, Floyd K. Warning: This Report Is Out-of-Date. in Particular, Entire Time-Series of Tb Disease Burden Estimates Are Updated Every Year. for the Latest Data and Analysis, Please See the Most Recent Edition of the Global Tb Report. 2019; Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
37. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. 2020.
38. Slaven, Ellen M. - Stone, Susan C. - Lopez FA. Doenças Infecciosas: Diagnóstico e Tratamento nos Setores de Emergência. McGraw, editor. 2008. 473 p.
39. Campos HS. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas TT - Tuberculosis: etiopathogenesis and clinical presentations. Pulmão RJ [Internet]. 2006;15(1):29–35. Available from: http://www.sopterj.com.br/profissionais/_revista/2006/n_01/01.pdf
40. Nachiappan AC, Rahbar K, Shi X, Guy ES, Mortani Barbosa EJ, Shroff GS, et al. Pulmonary tuberculosis: Role of radiology in diagnosis and management. Radiographics. 2017;37(1):52–72.
41. Ferreira GL, Flynn MN. Artigo Original Artigo Original. 2012;34(12):128–39.
42. Boffo MMS, Mattos IG de, Ribeiro MO, Oliveira Neto IC de. Tuberculose associada à AIDS: características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes atendidos em um serviço de referência do sul do Brasil. J Bras Pneumol. 2004;30(2):140–6.
43. Zamarioli LA, Coelho AGV, Pereira CM, Ferrazoli L, Bammann RH. Identificação laboratorial de micobactérias em amostras respiratórias de pacientes HIV-positivos com suspeita de tuberculose. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(3):290–7.
44. Ueki SYM, Martins MC, Telles MA da S, Virgílio MC, Giampaglia CMS, Chimara E, et al. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. J Bras Patol e Med Lab. 2005;41(1):1–8.
45. Projecto D, Estágio R De, Alexandra A, Vaqueiro M, Dra O, Maria A, et al. Universidade do Porto Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar Centro Hospitalar do Porto / Hospital Geral de Santo António Para a disciplina : Aspectos distintos da Tuberculose em imunocompetentes e imunocomprometidos : epidemiologia , manifestaç. 2009;1–22.
46. Mello FC de Q. Modelos Preditivos para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar Paucibacilar. 2001;(i):186.

47. Hopewell PC, Sanchez MA, Moss AR. • © 199 5. :815–21.
48. Borgdorff MW, Floyd K, Broekmans JF. Interventions to reduce tuberculosis mortality and transmission in low- and middle-income countries. *Bull World Health Organ.* 2002;80(3):217–27.
49. Conde MB, de Melo FAF, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin P de TR, et al. III Brazilian thoracic association guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol.* 2009;35(10):1018–48.
50. Coelho AGV, Zamarioli LA, Perandonos CA, Cuntiere I, Waldman EA. Características da tuberculose pulmonar em área hiperendêmica: município de Santos (SP). *J Bras Pneumol.* 2009;35(10):998–1007.
51. Storla DG, Yimer S, Bjune GA. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *BMC Public Health.* 2008;8:1–9.
52. World Health Organization. Definitions and reporting framework for tuberculosis - 2013 revision (updated Dec 2014 and Jan 2020) (WHO/ HTM/TB/2013.2) [Internet]. Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2020. 20455 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611033>
53. NICE. NICE guideline Published: 13 January 2016 www.nice.org.uk/guidance/ng33 ©. 2020;(September 2019).
54. WHO. Consolidated Guidelines on Tuberculosis Treatment. Who. 2016. 99 p.
55. Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, et al. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(4):603–62.
56. Duarte R, Carvalho A, Ferreira D, Saleiro S, Lima R, Mota M, et al. Tuberculosis treatment and management of some problems related to the medication. *Rev Port Pneumol [Internet].* 2010;16(4):559–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0873-2159\(15\)30052-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0873-2159(15)30052-0)
57. Bothamley G. Drug Treatment for Tuberculosis during Pregnancy. *Drug Saf.* 2001;24(7):553–65.
58. Treatment of tuberculosis. *Prescrire Int.* 2000;9(48):124–5.
59. Antunes A, Carvalho A, Gonçalves A, Ferreira B, Ribeiro C, dos Santos C, et al. Manual de Tuberculose e Micobactérias não tuberculosas. Programa Nac para a

Tuberc [Internet]. 2016;1–42. Available from: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/manual-de-tuberculose-e-micobacterias-nao-tuberculosas-recomendacoes-pdf.aspx>

60. Ryom L, Cotter A, De Miguel R, Béguelin C, Podlekareva D, Arribas JR, et al. 2019 update of the European AIDS Clinical Society Guidelines for treatment of people living with HIV version 10.0. *HIV Med.* 2020;21(10):617–24.
61. Walker NF, Stek C, Wasserman S, Wilkinson RJ, Meintjes G. The tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome: recent advances in clinical and pathogenesis research. *Curr Opin HIV AIDS.* 2018;13(6):512–21.
62. Zaleskis R. Postgraduate Course ERS Copenhagen 2005 - The side-effects of TB therapy. *Breathe.* 2005;2(1):69–73.
63. Gheorghiu M. The present and future role of BCG vaccine in tuberculosis control. *Biologicals.* 1990;18(2):135–41.
64. Sekhuis VM, Freudenstein H, Sirks JL. Report on results of a collaborative assay of BCG vaccines organized by the International Association of Biological Standardization. *J Biol Stand.* 1977;5(2):85–109.
65. Osborn TW. Changes in BCG strains. *Tubercle.* 1983;64(1):1–13.
66. Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine.* 2003;21(27–30):4270–4.
67. Inwald J, Jahans K, Hewinson RG, Gordon S V. Inactivation of the *Mycobacterium bovis* homologue of the polymorphic RD1 gene Rv3879c (Mb3909c) does not affect virulence. *Tuberculosis.* 2003;83(6):387–93.
68. Gagliardi MC, Teloni R, Mariotti S, Iona E, Pardini M, Fattorini L, et al. *Bacillus Calmette-Guérin* shares with virulent *Mycobacterium tuberculosis* the capacity to subvert monocyte differentiation into dendritic cell: Implication for its efficacy as a vaccine preventing tuberculosis. *Vaccine.* 2004;22(29–30):3848–57.
69. Germanier R. *Bacterial Vaccines.* 1st ed. Academic Press, editor. 1984.
70. Kamphuis JT, Buiting AGM, Miseré JFMM, Van Berge Henegouwen DP, Van Soolingen D, Rensma PL. BCG immunotherapy: Be cautious of granulomas: Disseminated BCG infection and mycotic aneurysm as late complications of intravesical BCG instillations. *Neth J Med.* 2001;58(2):71–5.
71. Han TII, Kim IO, Kim WS, Yeon KM. Disseminated BCG Infection in a Patient with Severe Combined Immunodeficiency. *Korean J Radiol.* 2000;1(2):114–7.

72. Fallo A, De Matteo E, Preciado MV, Cerqueiro MC, Escoms S, Chabay P, et al. Epstein-Barr virus associated with primary CNS lymphoma and disseminated BCG infection in a child with AIDS. *Int J Infect Dis.* 2005;9(2):96–103.
73. Tala-Heikkilä MM, Tuominen JE, Tala EOJ. Bacillus Calmette-Guérin revaccination questionable with low tuberculosis incidence. *Pneumologie.* 1998;52(11):626.
74. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017 Document WHO/HTM/TB/2017.23. Geneva. [Internet]. 2017. 2017 p. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf
75. Warren RM. Danish Bacille Calmette-Guérin Vaccine – Induced Disease in Human Immunodeficiency Virus – Infected Children. 2003;37.
76. Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology.* 2010;15(2):220–40.
77. Anbarasu S, Selvakumar N, Kumar V. MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE PULMONAR. *J Commun Dis.* 2012;44(3):119–28.
78. Osório Ferri A, Aguiar B, Mörschbacher Wilhelm C, Schmidt D, Fussieger F, Ulrich Picoli S. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. *Rev Lib.* 2014;15(24):145–54.
79. Standards D. 10.1164@Ajrccm.161.4.16141. 2000;161:1376–95.
80. Merchant S, Bharati A, Merchant N. Tuberculosis of the genitourinary system- Urinary tract tuberculosis: Renal tuberculosis-Part i. *Indian J Radiol Imaging.* 2013;23(1):46–63.
81. Chang KC, Leung CC, Yew WW, Tam CM. Supervised and induced sputum among patients with smear-negative pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J.* 2008;31(5):1085–90.
82. MUSSI VDO. CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE *Mycobacterium kansasii* ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR NÃO TUBERCULOSA. *Univ ESTADUAL DO NORTE Flum DARCY RIBEIRO - UENF.* 2017;4:9–15.
83. Etanol QSP. Coloração ziehl-neelsen neelsen. 2018;1–3.
84. Vasanthakumari R, Jagannath K, Rajasekaran S. A cold staining method for acid-fast bacilli. *Bull World Health Organ.* 1986;64(5):741–3.
85. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle.* 1970;51(2):196–206.

86. Ryu YJ. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: Recent advances and diagnostic algorithms. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2015;78(2):64–71.
87. Bonnet M, Ramsay A, Gagnidze L, Githui W, Guerin PJ, Varaine F. Reducing the number of sputum samples examined and thresholds for positivity: An opportunity to optimise smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11(9):953–8.
88. Kinyoun JJ. a Note on Uhlenhuths Method for Sputum Examination, for Tubercle Bacilli. *Am J Public Health*. 1915;5(9):867–70.
89. Speranza V Della, Fail R, Madan G. Phenol Myth Unveiled! Were Ziehl-Neelsen and Kinyoun Mistaken? 2000;XXXIII(2).
90. McCollough CB. Application of an aqueous acid-fast staining technique to detect pathogens of aquatic species. *Biotech Histochem*. 2008;83(3–4):191–7.
91. – IL de OC, Neves CD. MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE PULMONAR. *Fac Multivix Cachoeiro Itapemirim*. 1386;283.
92. Ministerio da Saúde Moçambique. Manual de Baciloscopia da Tuberculose. *Man Baciloscopia da Tuberc*. 2005;3º edição:242.
93. Vi M. Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica.
94. Oplustil CP, Teixeira SR, Osugui SK, Mendes CF. Impacto da automação no diagnóstico de infecções por micobactérias. *J Bras Patol e Med Lab*. 2002;38(3).
95. Lewinsohn DM, Leonard MK, Lobue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. *Clin Infect Dis*. 2017;64(2):e1–33.
96. Robin E. Huebner et al. The Tuberculin Skin Test. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1993;17(6):968–975. Available from: www.jstor.org/stable/4457498. Accessed 5 July 2021.
97. Shinnick TM, King CH, Quinn FD. Molecular biology, virulence, and pathogenicity of mycobacteria. *Am J Med Sci* [Internet]. 1995;309(2):92–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00000441-199502000-00007>
98. Trajman A, Pai M, Dheda K, Van Zyl Smit R, Zwerling AA, Joshi R, et al. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: What works and what does not? *Eur Respir J*. 2008;31(5):1098–106.
99. Pai M, Ramsay A, O'Brien R. Evidence-based tuberculosis diagnosis. *PLoS Med*. 2008;5(7):1043–9.

100. Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*. 1993;17(6):968–75.
101. Takahashi T, Tamura M, Asami Y, Kitamura E, Saito K, Suzuki T, et al. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA: Clinical application for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol*. 2008;46(5):1698–707.
102. JK. A. A modified Ziehl-Neelsen stain for mycobacteria. *Med Lab Sci*. (49(2):99-102).
103. Marks J. Notes on the ziehl-neelsen staining of sputum. *Tubercle*. 1974;55(3):241–4.
104. de Wit D, Maartens G, Steyn L. A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Tuber Lung Dis*. 1992;73(5):262–7.
105. Seiler P, Ulrichs T, Bandermann S, Pradl L, Jörg S, Krenn V, et al. Cell-Wall Alterations as an Attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in Latent Infection. *J Infect Dis*. 2003;188(9):1326–31.
106. Gomes A, Amaral P, Santos R, Santos S, Tortosa F, Mendonça P, et al. GASMoC method: a phenol-free technique to detect acid-fast bacilli. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 2020;153(1):63–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01825-0>
107. Ratnam S, March SB. Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1986;23(3):582–5.
108. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(10):664–74.
109. Cattamanchi A, Dowdy DW, Davis JL, Worodria W, Yoo S, Joloba M, et al. Sensitivity of direct versus concentrated sputum smear microscopy in HIV-infected patients suspected of having pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2009;9:1–9.
110. Bonnet M, Ramsay A, Githui W, Gagnidze L, Varaine F, Guerin PJ. Bleach sedimentation: An opportunity to optimize smear microscopy for tuberculosis diagnosis in settings of high prevalence of HIV. *Clin Infect Dis*. 2008;46(11):1710–6.
111. Ängeby KAK, Hoffner SE, Diwant VK. Should the “bleach microscopy method” be

- recommended for improved case detection of tuberculosis? Literature review and key person analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(7):806–15.
112. Singhal R, Bhalla M, Chakraborty S, Singh N, Behera D, Myneedu VP. Phenol-ammonium sulfate microscopy method for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Mycobacteriology* [Internet]. 2013;2(2):84–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2013.03.003>
113. Farnia P, Mohammadi F, Zarifi Z, Tabatabaee DJ, Ganavi J, Ghazisaeedi K, et al. Improving sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum: Use of chitin in mucus digestion. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):508–11.
114. WILKINSON FF. Modificación a la tecnica de Ziehl-Neelsen en las baciloscopias de los enfermos de lepra tratados consulfonas. *Int J Lepr.* 1951;19(2):195–8.
115. Van Deun A, Salim AH, Aung KJM, Hossain MA, Chambugonj N, Hye MA, et al. Performance of variations of carbolfuchsin staining of sputum smears for AFB under field conditions. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9(10):1127–33.
116. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(9):570–81.
117. Bhalla M, Sidiq Z, Sharma PP, Singhal R, Myneedu VP, Sarin R. Performance of light-emitting diode fluorescence microscope for diagnosis of tuberculosis. *Int J Mycobacteriology* [Internet]. 2013;2(3):174–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2013.05.001>
118. Reza LW, Satyanarayana S, Enarson DA, Kumar AMV, Sagili K, Kumar S, et al. LED-Fluorescence Microscopy for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis under Programmatic Conditions in India. *PLoS One.* 2013;8(10).
119. Qin D, He X, Wang K, Zhao XJ, Tan W, Chen J. Fluorescent nanoparticle-based indirect immunofluorescence microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biomed Biotechnol.* 2007;2007.
120. Cambanis A, Ramsay A, Wirkom V, Tata E, Cuevas LE. Investing time in microscopy: An opportunity to optimise smear-based case detection of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11(1):40–5.
121. Siqueira LF de G, Almeida RG de, Belda W. Métodos tintoriais utilizados na identificação do *Mycobacterium leprae*: revisão histológica. *Rev Saude Publica.* 1984;18(3):246–58.

122. Stahnke H, Kittlaus S, Kempe G, Alder L. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? *Anal Chem.* 2012;84(3):1474–82.
123. Adan CBD, Sato EH, Sousa LB, Oliveira RS, Leão SC, Freitas D. An experimental model of mycobacterial infection under corneal flaps. *Brazilian J Med Biol Res.* 2004;37(7):1015–21.
124. Yokoyama T, Kinoshita T, Okamoto M, Matsunaga K, Kamimura T, Kinoshita M, et al. High detection rates of urine *Mycobacterium tuberculosis* in patients with suspected miliary tuberculosis. *Intern Med.* 2017;56(8):895–902.
125. Dennis Falzon, Haileyesus Getahun, Malgosia Grzemska, Jean de Dieu Iragena, Ernesto Jaramillo, Knut Lönnroth, Alberto Matteelli, Fuad Mirzayev, Ikushi Onozaki, Mario Raviglione, Wayne Van Gemert FW and KW. IMPLEMENTING TUBERCULOSIS Policy framework TUBERCULOSIS Policy framework. 2015;WHO/HTM/TB:1–47.
126. Ulukanligil M, Aslan G, Taşçi S. A Comparative Study on the Different Staining Methods and Number of Specimens for the Detection of Acid Fast Bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(6):855–8.
127. Mortier E, Pouchot J, Girard L, Boussougant Y, Vinceneux P. Assessment of urine analysis for the diagnosis of tuberculosis. *Br Med J.* 1996;312(7022):27–8.
128. Moussa OM, Eraky I, El-Far MA, Osman HG, Ghoneim MA. Rapid diagnosis of genitourinary tuberculosis polymerase chain reaction and non-radioactive DNA hybridization. *J Urol.* 2000;164(2):584–8.
129. Tuberculose DDA. Diagnóstico da tuberculose. 2006;15(2):92–9.
130. Bartlett RC. *Medical microbiology : quality cost and clinical relevance.* Print book. New York Wiley 1974; 1974.
131. Saleh MA, Khaleel KJ, Abdulameer L, Alsaadi S. Comparison between polymerase chain reaction and Ziehl Neelsen stain for detection renal tuberculosis Original Research Article Comparison between polymerase chain reaction and Ziehl Neelsen stain for detection renal tuberculosis. 2020;(June 2014).
132. R B H Gradwohl, Alex C Sonnenwirth LJ. *Gradow's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis.* 8 ed. Saint Louis: C.V. Mosby, 1980; 1980.
133. c9129_31.
134. Angus K. Cryptosporidiosis in domestic animals and human. In: *Cryptosporidiosis of*

Man and Animals. 1987. p. 47–9.