



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

GÉRSON FONTANA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS MÉTODOS DE
DIGESTÃO/DESCONTAMINAÇÃO DE ESCARRO PARA CULTURA
DE MICOBACTÉRIAS**

**VITÓRIA
2019**

GÉRSON FONTANA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS MÉTODOS DE
DIGESTÃO/DESCONTAMINAÇÃO DE ESCARRO PARA CULTURA
DE MICOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças Infecciosas
do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Espírito Santo,
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Doenças Infecciosas.
Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Sousa de
Almeida Júnior

**VITÓRIA
2019**

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

Fontana, Gérson, 1986-

X000x Desenvolvimento e avaliação de novos métodos de
digestão/descontaminação de escarro para cultura de micobactérias
/ Gérson Fontana. – 2019.
000 f. : il.

Orientador: Moisés Palaci.

Coorientador: Pedro Sousa de Almeida Júnior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Clorexidina. 3. OMNIGene®.
I. Palaci, Moisés. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU:61



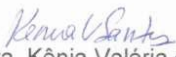
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

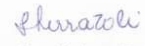
**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

O mestrando Gérson Fontana apresentou a dissertação intitulada "Desenvolvimento e avaliação de novos métodos de digestão/descontaminação de escarro para cultura de micobactérias" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (☒) **aprovar** (☐) **reprovar** a dissertação habilitando o farmacêutico Gérson Fontana a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, 12 de dezembro de 2019.


Prof. Dra. Kênia Valéria dos Santos
(Membro Interno)


Prof. Dra. Lucilaine Ferrazoli
(Membro Externo)

*Dedico esse trabalho aos meus pais e irmão (in memorian), que me ensinaram
valores importantes para toda a vida.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar presente em toda essa trajetória, por ter me dado saúde e força para conseguir desempenhar todas minhas atividades com responsabilidade e dedicação;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moisés Palaci, pela orientação e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, com suas críticas construtivas, discussões e reflexões que foram fundamentais para conclusão dessa dissertação de mestrado;

A minha irmã, Cláudia Lourdes Fontana, que desempenha uma função de mãe, pelo carinho, amor, preocupação que tem por mim e apoio constante para progredir cada vez mais na vida. Tata, sou muito grato a você.

A minha noiva Mayra Pereira P. Penha, pela compreensão, paciência e companheirismo nesse período do mestrado, que me ajudou e incentivou nos estudos, para crescer profissionalmente cada vez mais. Agradeço muito, cada instante, cada artigo que me ajudou a traduzir, cada minuto que ficou ao meu lado para ouvir meus desabafos e concluir essa etapa;

A Brunelli da Rós Peruch, uma verdadeira amiga, e também colega de trabalho, onde pude contar em todas minhas dificuldades, ela estava disposta a ler, corrigir e opinar suas ideias. Meus sinceros agradecimentos;

Ao Luiz Guilherme, que se tornou uma pessoa especial, por sempre estar disposto a ajudar e compartilhar todo seu conhecimento. Obrigado por cada palavra que colaborou para a conclusão dessa dissertação;

Aos meus colegas de trabalho, João Batista, Leduc Mageski, pelo apoio que me deram e compreensão quando tive que me ausentar por alguns momentos do serviço;

Ao Pedro Sousa de Almeida Jr., por me coorientar desde o início do mestrado, com ideias brilhantes, fazendo seus desenhos de estudos e assim eu seguir nos experimentos;

Ao prof. Dr. Crispim, pela colaboração nas análises estatística do trabalho;

Aos amigos, alunos e pesquisadores do Núcleo de Doenças Infecciosas: Solange, Renata, Adeilton, Manuela, Mariana, Júlia por estarem sempre ao meu lado, tirando minhas dúvidas e colaborando nos experimentos;

Aos membros da minha banca examinadora, Profa. Dra. Kênia Valéria dos Santos e Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli, por terem aceitado o convite para a minha defesa de dissertação.

*“A sabedoria dos homens é proporcional não à sua experiência, mas à sua
capacidade de adquirir experiência.”*
(George Bernard Shaw)

RESUMO

O diagnóstico rápido e preciso e o tratamento adequado de pessoas com tuberculose pulmonar são os pilares primordiais para o controle dessa doença. A cultura de micobactérias é considerada padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose, porém, a contaminação dos meios de cultura é um dos principais problemas que interfere no isolamento de micobactérias na rotina laboratorial, prejudicando e prolongando o diagnóstico, consequentemente retardando o início do tratamento e aumentando os riscos de transmissão. Na tentativa de diminuir a contaminação nos exames de culturas, este estudo propôs a desenvolver e avaliar novos métodos diretos de digestão/descontaminação de escarro para cultura de micobactérias, utilizando diferentes descontaminantes, sendo dividido em três fases. Na primeira fase, foi realizada análise da interferência dos reagentes na viabilidade de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Na segunda fase foi realizado comparativo de métodos diretos utilizando como descontaminante o hidróxido de sódio (NaOH), a clorexidina (CHX) e o OMNIGene®. Na terceira fase, foram realizadas modificações nos métodos diretos para incluir etapas de fluidificação e de neutralização, além de avaliação de diferentes tempos de ação dos reagentes, a fim de otimizar os métodos desenvolvidos. Os resultados demonstraram que a CHX interfere menos que o NaOH na viabilidade de MTB e que um método direto de descontaminação com CHX 7% (proporção 1:10) por 15 minutos, com etapas de fluidificação da amostra e de neutralização do reagente, proporciona resultados equivalentes ao método direto padrão com NaOH 4%. Em todos os testes realizados com o reagente OMNIGene® os resultados foram similares ao método padrão com NaOH. Com este estudo, foi possível desenvolver e avaliar dois novos métodos diretos de digestão/descontaminação de escarro para semeadura em meios de cultura sólidos e isolamento de micobactérias utilizando CHX e OMNIGene®.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, escarro espontâneo, contaminação de culturas, diagnóstico, clorexidina, OMNIGene®.

ABSTRACT

Rapid and accurate diagnosis and appropriate treatment for people with pulmonary tuberculosis are the main pillars for the control of this disease. Culture of mycobacteria is considered the gold standard for the diagnosis of tuberculosis, but contamination of culture media is one of the main problems that interferes with the isolation of mycobacteria in the laboratory routine, impairing and prolonging the diagnosis, consequently delaying the start of treatment and increasing the risks of transmission. In an attempt to reduce contamination in culture exams, this study aims to develop and evaluate new direct methods of sputum digestion / decontamination for culture of mycobacteria, using different decontaminants, being divided into three phases. In the first phase, it was performed an analysis of the interference of the reagents on the viability of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). In the second phase, direct methods were compared using sodium hydroxide (NaOH), chlorhexidine (CHX) and OMNIGene®. In the third phase, modifications were made to the direct methods to include fluidification and neutralization steps, as well as evaluation of different exposure times of reagents, in order to optimize the developed methods. The results demonstrated that CHX interferes less than NaOH on MTB viability and that a direct decontamination method with CHX 7% (1:10 ratio) for 15 minutes, with sample fluidification and reagent neutralization steps, provide equivalent results to the standard direct method with NaOH 4%. In all tests performed with OMNIGene® the results were similar to the standard NaOH method. With this study, it was possible to develop and evaluate two new direct methods of sputum digestion / decontamination for seeding in solid culture media and isolation of mycobacteria using CHX and OMNIGene®.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, spontaneous sputum, culture contamination, diagnosis, chlorhexidine, OMNIGene®.

SIGLAS E ABREVIATURAS

BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
CHX	Clorexidina
D.O.	Densidade Óptica
EE	Escarro espontâneo
et al.	e colaboradores
HIV	do inglês “ <i>Human Immunodeficiency Vírus</i> ”
LJ	Lowenstein-Jensen
min	minuto
mL	mililitros
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NALC	N-acetil-L-cisteína
NaOH	Hidróxido de Sódio
NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
nm	nanômetro
OK	Ogawa-Kudoh
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
TB	Tuberculose
TBP	Tuberculose pulmonar
TBEP	Tuberculose extrapulmonar
TRM-TB	Teste rápido molecular para tuberculose
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
°C	graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxas de incidência estimadas de TB em 2017.....	21
Figura 2: Classificação de países prioritários para o período de 2016 a 2020.....	22
Figura 3: Leitura e interpretação dos resultados de baciloscopia de escarro.....	23
Figura 4: Fluxograma de seleção de amostra.....	36
Figura 5: Esquema para realização de descontaminação das amostras utilizando os métodos diretos OK, CHX e OMNIGene®.....	38
Figura 6: Esquema da inclusão da etapa de fluidificação das amostras para posterior descontaminação utilizando CHX 0,7% e OMNIGene®	39
Figura 7: Esquema da fluidificação e neutralização para descontaminação com adição de CHX 7%.....	40
Figura 8: Esquema para realização de descontaminação das amostras utilizando OMNIGene® em diferentes tempos.....	41
Figura 9: Esquema do ensaio de isolamento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> após exposição a CHX em diferentes concentrações e NaOH 4%.....	42
Figura 10: Ação dos descontaminantes NaOH e CHX sobre o crescimento de MTB H37Ra ATCC 25177.....	46
Figura 11: Avaliação da descontaminação de amostras de escarro com NaOH e CHX.....	47

Figura 12: Avaliação da descontaminação de amostras de escarro com NaOH e CHX e OMNIGene®48

Figura 13: Avaliação da descontaminação e isolamento de micobactérias em amostras de escarro após digestão mecânica e exposição a CHX e OMNIGene® em diferentes intervalos de tempo.....49

Figura 14: Avaliação da descontaminação e isolamento de micobactérias em amostras de escarro após digestão mecânica e exposição a CHX seguida de neutralização.....51

Figura 15: Avaliação da descontaminação e isolamento de micobactérias em amostras de escarro após exposição a OMNIGene® em 24 horas.....52

Figura 16: Avaliação da descontaminação e isolamento de micobactérias em amostras de escarro após exposição a OMNIGene® em diferentes intervalos de tempo.....53

Figura 17: Liquefação das amostras após exposição com o OMNIGene®53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ação dos descontaminantes sobre o crescimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	46
Tabela 2: Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização de descontaminação das amostras utilizando os Métodos Diretos OK, CHX e OMNIGene®.....	49
Tabela 3: Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização da etapa de fluidificação (CHX e OMNIGene®) e posterior descontaminação das amostras utilizando os Métodos Diretos CHX e OMNIGene®.....	50
Tabela 4: Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização da etapa de fluidificação e posterior descontaminação e neutralização das amostras utilizando CHX 7%.....	51
Tabela 5: Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização da etapa de descontaminação das amostras utilizando OMNIGene® em 24 horas.....	52
Tabela 6: Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização da etapa de descontaminação das amostras utilizando OMNIGene® em diferentes intervalos de tempo.....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 HISTÓRICO.....	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA	21
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TUBERCULOSE	24
2.3.1 Exame Microscópico Direto – Baciloscopia Direta.....	24
2.3.2 Teste Rápido Molecular para Tuberculose (TRM-TB)	25
2.3.3 Exame de Cultura	26
2.3.3.1 Amostras Clínicas.....	27
2.3.3.1.1 Método Petroff Modificado	28
2.3.3.1.2 Método N-Acetil-L-Cisteína-Hidróxido de Sódio (NALC/NaOH) ...	29
2.3.3.1.3 Método Ogawa-Kudoh (OK).....	29
2.3.3.2 Descontaminação com Clorexidina	29
2.3.3.3 Descontaminação com OMNIGene®	30
2.4 JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL.....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 ESTRATÉGIA DO ESTUDO.....	35
4.1.1 Delineamento.....	35
4.1.2 Modelo de estudo	35
4.1.3 Local	35
4.1.4 Desenho.....	35
4.2 AMOSTRAS CLÍNICAS	36
4.2.1 Critérios de Inclusão	36
4.2.2 Critérios de Exclusão	36
4.2.3 Fluxograma de seleção.....	36
4.3 ENSAIOS LABORATORIAIS.....	38

4.3.1 Ação dos descontaminantes sobre o crescimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
4.3.1.1 Isolamento nos métodos diretos de descontaminação	38
4.3.1.2 Leitura após incubação.....	39
4.3.2 Descontaminação de amostras pelos métodos diretos.....	40
4.3.2.1 Descontaminação pelo método de Ogawa-Kudoh.....	40
4.3.2.2 Descontaminação com Clorexidina	40
4.3.2.3 Descontaminação com OMNIGene®	40
4.3.3 Descontaminação de amostras pelos métodos diretos modificados.....	41
4.3.3.1 Fluidificação para descontaminação com Clorexidina 0,7% e OMNIGene®	41
4.3.3.2 Processamento das amostras pela adição de Clorexidina 7%	42
4.3.3.3 Descontaminação utilizando OMNIGene® em diferentes tempos.....	43
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
4.5 ASPECTOS ÉTICOS.....	44
5. RESULTADOS	46
5.1 AÇÃO DOS DESCONTAMINANTES SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	46
5.1.1 Isolamento nos métodos diretos de descontaminação	46
5.2 DESCONTAMINAÇÃO DE AMOSTRAS PELOS MÉTODOS DIRETOS	48
5.3 DESCONTAMINAÇÃO DE AMOSTRAS PELOS MÉTODOS DIRETOS MODIFICADOS	50
5.3.1 Fluidificação para descontaminação com Clorexidina 0,7% e OMNIGene®	50
5.3.2 Processamento das amostras pela adição de Clorexidina 7%	51
5.3.3 Descontaminação utilizando OMNIGene® em diferentes tempos	52
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	64
8. REFERÊNCIAS.....	66

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Apesar de ser uma doença que acomete o ser humano desde a pré-história, permanece como um dos grandes problemas de saúde pública mundial (SAKULA, 1982; ZUMLA et al., 2013; PAI et al., 2016; WHO, 2018).

As maiores taxas de incidência e de carga da doença estão nos países de renda baixa e média, pois a TB está ligada a fatores sociais como: má distribuição de renda, desemprego, habitação insalubre, dentre outros. Apresenta características sociais e demográficas específicas, sendo encontrada em grandes centros onde a densidade populacional é alta e muitas vezes associada a outras doenças como na co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2018).

Apesar da disponibilidade de tratamento gratuito e eficaz, a TB ainda apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade em todo mundo (ZUMLA et al., 2013). Estima-se que em 2017 a TB causou 1,3 milhão de mortes entre pessoas soronegativas e houve um aumento de 300.000 mortes por TB entre os pacientes infectados pelo HIV. Em todo o mundo, a TB é uma das 10 principais causas de morte e a principal causa de um único agente infeccioso (acima de HIV / AIDS). Milhões de pessoas continuam doentes com TB a cada ano (WHO, 2018).

O diagnóstico da TB pode ser realizado através de exames laboratoriais como a baciloscopia, a utilização de técnicas de biologia molecular ou a cultura. A baciloscopia, apesar de ser uma técnica rápida e de baixo custo, possui algumas limitações referentes à baixa sensibilidade e especificidade, sendo que para um exame de baciloscopia ser positivo, é necessário um número mínimo de 5.000 bacilos por mililitro (mL) de secreção (HOBBY et al., 1973). Os testes envolvendo a biologia molecular também são de detecção rápida, pois permitem um resultado aproximadamente de 3 a 48 horas, porém essas técnicas possuem custos elevados e necessitam de laboratórios com infraestrutura adequada e profissionais capacitados (PAI et al., 2016).

Por sua vez, a cultura permite a multiplicação e o isolamento dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) a partir da semeadura da amostra em meios específicos para micobactérias, líquidos ou sólidos. É um método de alta sensibilidade e especificidade capaz de detectar de 10 a 100 bacilos cultiváveis por mililitro de

escarro. Por causa disso, nenhum outro método diagnóstico demonstrou uma sensibilidade maior que o exame de cultura, principalmente em amostras de pacientes paucibacilares, sendo considerado o método padrão-ouro no diagnóstico da TB (HOBBY et al., 1973; PALOMINO, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008).

A contaminação dos meios de cultura, porém, é um dos principais problemas que interfere no isolamento de MTB na rotina laboratorial, prejudicando e prolongando o diagnóstico da doença, consequentemente retardando o início do tratamento do paciente e aumentando os riscos de transmissão da doença (KASSAZA et al., 2014). Para reduzir este problema é necessário eliminar a microbiota associada à amostra, que cresce mais rapidamente que as micobactérias, contaminando o meio de cultura e impedindo a multiplicação dos bacilos. Para isso são utilizados métodos de descontaminação das amostras antes de inoculá-las no meio de cultura (KENT; KUBICA, 1985). Porém, mesmo com os métodos atualmente preconizados, muitos laboratórios têm tido dificuldade em lidar com a contaminação das culturas (PERES, R. L. et al., 2011; KASSAZA et al., 2014).

Devido a elevadas taxas de contaminações nos meios de cultura de exames realizados rotineiramente para diagnóstico de TB, tornam-se necessários novos métodos de descontaminação de escarro na tentativa de diminuir a contaminação nos exames de culturas dos pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar (TBP), sem reduzir e afetar o crescimento e o isolamento de micobactérias nos meios de culturas (PERES, R. et al., 2011; KASSAZA et al., 2014), contribuindo para um melhor diagnóstico e maior agilidade no tratamento.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A TB é uma das doenças mais antigas da humanidade. É suposto que as micobactérias tenham se originado há mais de 150 milhões de anos e o MTB tenha matado mais que qualquer outro microrganismo patogênico. Devido as suas diversas formas, a doença foi confundida com várias outras recebendo diferentes denominações como Escrófula (TB ganglionar), Lupus vulgaris (TB cutânea) e Doença de Pott (TB óssea) e “phthisis”, nome grego que foi adaptado à língua portuguesa como tísica e que significava “definindo”. Hipócrates reconheceu claramente a TB por volta de 460 a.C. e já suspeitava de sua natureza contagiosa que acometia jovens entre 18 e 35 anos de idade sendo quase sempre fatal. Em 1839 foi batizada de “tuberculosis” por Schönlein (SAKULA, 1982; BLOOM; MURRAY, 1992; DANIEL, 2006; BARBERIS et al., 2017).

Com grande prevalência desde a antiguidade, a TB tem deixado um rastro de morte na história da humanidade, com destaque para a grande epidemia no século XVIII que ficou conhecida como a “peste branca”, devido a palidez anêmica das pessoas afetadas pela doença. Nesse período, a infecção pelo MTB acometeu quase 100% da população europeia, sendo que a doença foi responsável por 25% de todas as mortes em adultos no continente (ZUMLA, 2011; BARBERIS et al., 2017).

Em 1720, pela primeira vez, a origem infecciosa da TB foi conjecturada pelo médico Benjamin Marten, ao suspeitar que a doença era causada por “criaturas vivas minúsculas”, que quando dentro do corpo do paciente poderiam gerar lesões e sintomas da tísica (PALOMINO et al., 2007). Entretanto, o microrganismo causador só foi descoberto em 1882 pelo bacteriologista alemão Robert Koch, quando denominou o agente etiológico da TB como *Bacterium tuberculosis* (SAKULA, 1982b; KATO-MAEDA et al., 2001). Porém a criação do gênero *Mycobacterium* por Lehmann e Neumann aconteceu somente 14 anos depois, quando o *B. tuberculosis* passou a ser denominado como *Mycobacterium tuberculosis* (SHINNICK; GOOD, 1994).

A descoberta da causa da TB abriu as portas para aquisição de novos conhecimentos sobre a doença. Hoje sabe-se que a infecção por MTB é transmitida

através de aerossóis produzidos pela tosse, espirros ou fala contendo partículas que medem 1-5µm compostas de dois a três bacilos viáveis provenientes de uma pessoa infectada. Os aerossóis podem permanecer na atmosfera por horas depois de gerados até serem inalados por uma pessoa susceptível (WELLS et al., 1948; KNECHEL, 2009). Diversos fatores podem influenciar no risco da infecção evoluir para doença, dentre eles condições relacionadas à carga bacteriana inalada, defesas imunes do indivíduo e o contato estreito entre pessoas (AHMAD, 2011).

Existem dois tipos de manifestações clínicas da doença que são a TBP, que ocorre com mais frequência, e a TB extrapulmonar (TBEP) que infecta outros órgãos como a pleura, nódulos linfáticos, abdômen, pele, ossos, dentre outros (LEE, 2015; WHO, 2018). Os sinais e sintomas da TBP são tosse, produtiva e/ou sanguinolenta, dor no peito, fraqueza, perda de peso, febre e suor noturno, sendo variáveis de acordo com o tempo de inalação da doença (PAI et al., 2016).

MTB é um bacilo caracterizado, principalmente, por sua falta de motilidade, ser ácido-álcool resistente e de crescimento lento. É membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por *M. tuberculosis*, agente etiológico da TB humana; *M. africanum*, causador de TB em humanos somente em certas regiões da África; *M. bovis*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*, que causam TB em mamíferos domésticos e selvagens; *M. microti*, que causa TB em ratos silvestres, *M. Canetti* que também infecta humanos (DELOGU et al., 2013) e mais recentemente *M. mungi* que foi identificado em 2010 como causador de TB em mangustos na África, o *M. orygis* em 2012 e o *M. surricatae* em 2013 (ALEXANDER et al., 2010; AZÉ et al., 2015).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Em 2017, no mundo todo, 6,4 milhões de novos casos de TB foram oficialmente notificados à Organização Mundial da Saúde (OMS), representando 64% dos 10,0 milhões de novos casos estimados nesse ano. A incidência global da TB está caindo cerca de 2% ao ano desde 2000. No entanto, para atingir a meta da Estratégia pelo Fim da Tuberculose da OMS de redução da incidência da TB para menos de 10 casos por 100 mil habitantes até 2035, seria necessária uma redução global de 4 a 5% ao ano. A gravidade da epidemia de TB em termos do número anual de casos incidentes em relação ao tamanho da população (taxa de incidência) variou amplamente entre

os países em 2017. Houve menos de 10 casos incidentes por 100.000 habitantes na maioria dos países de renda alta e 150 - 400 na maioria dos 30 países com alta carga de TB (Fig. 1) (WHO, 2018).

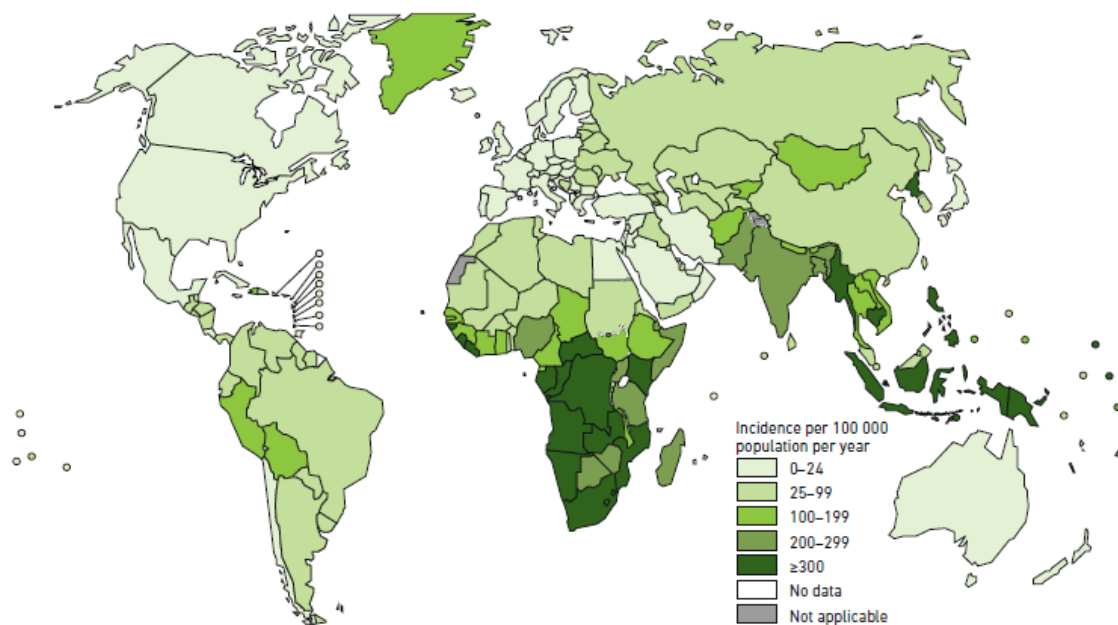


Figura 1. Taxas de incidência estimadas de TB em 2017.

Fonte: Adaptado WHO, 2018

No intuito de controlar a doença ao redor do mundo, a OMS, de acordo com as características epidemiológicas, definiu uma nova classificação de países prioritários para o período de 2016 a 2020, englobando três listas (carga da doença, co-infecção TB-HIV e multidrogarresistência). Cada lista é composta por 30 países, sendo que alguns destes aparecem em mais de uma lista, somando assim, um total de 48 países para a abordagem da TB (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017).

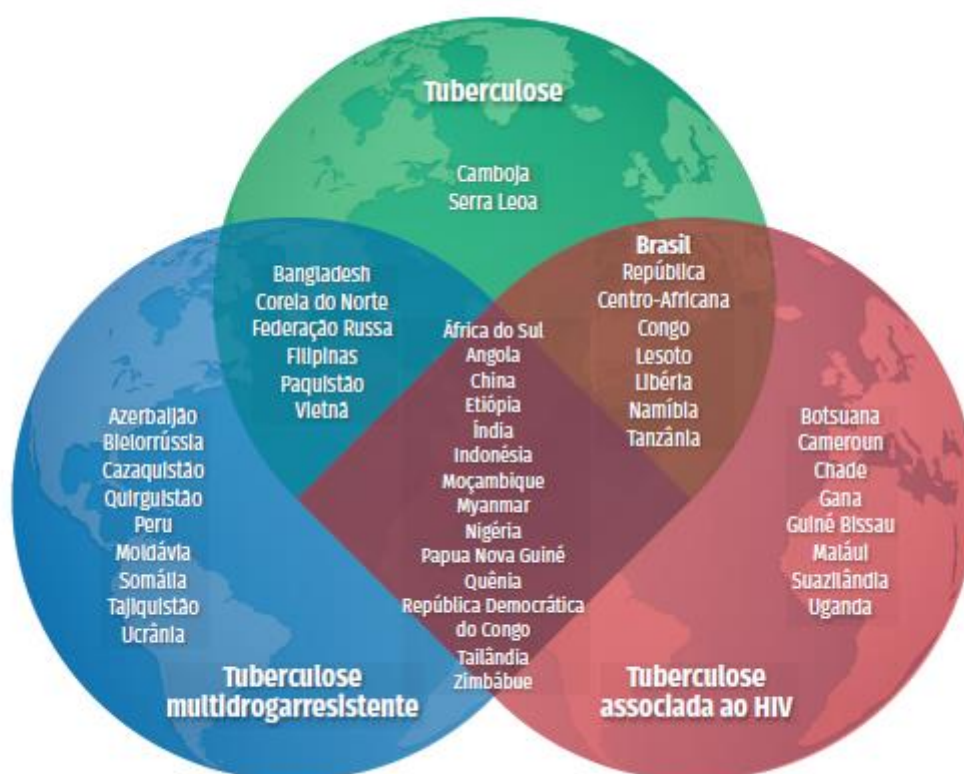


Figura 2. Classificação de países prioritários para o período de 2016 a 2020.

Fonte: Adaptado WHO, 2018

O Brasil se encontra em duas dessas listas, ocupando a 20ª posição quanto à carga da doença e a 19ª no que se refere à co-infecção TB-HIV, sendo um país considerado prioritário pela OMS para o controle da doença no mundo. Em 2015, o percentual de detecção da TB no país, segundo a OMS, foi de 87,0%. Nos últimos 10 anos, foram diagnosticados, em média, 71 mil casos novos da doença. Em 2017, o número de casos notificados foi de 72.770 e os coeficientes de incidência variaram de 10,0 a 74,7 casos por 100 mil habitantes entre os estados (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017).

No Espírito Santo foram identificados 1.218 novos casos da doença em 2018, dos quais 60% dos casos estão na região metropolitana, possuindo um coeficiente de incidência de 30 casos por 100 mil habitantes/ano. Sessenta e oito pessoas morreram vítimas da doença no Estado no mesmo período (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2019a).

2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TUBERCULOSE

O diagnóstico rápido e preciso e o tratamento adequado em pessoas com TBP são os pilares primordiais para o controle da doença, principalmente em regiões que possuem pacientes com alta carga bacilar. Os testes diagnósticos atuais de TB ainda são precários, especialmente em pacientes paucibacilares. Nestes casos é essencial discernir as principais causas clínicas que estão acometendo o paciente, abordando uma história e exames clínicos detalhados, além de exames radiológicos, histológicos e principalmente laboratoriais, como os exames microscópicos, microbiológicos ou moleculares, por serem os únicos capazes de confirmar o diagnóstico (COLEBUNDERS; BASTIAN, 2000; SEONG et al., 2014; RYU, 2015).

2.3.1 Exame Microscópico Direto – Baciloscopia Direta

A baciloscopia, ou exame microscópico, é a pesquisa do BAAR em um esfregaço da amostra clínica preparado, corado e observado ao microscópio (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). O método mais utilizado é o de Ziehl-Nielsen, que se baseia na coloração pela fucsina fenicada ao calor por cinco minutos, corando as micobactérias com uma cor fúcsia que não desaparece pela ação da mistura de álcool etílico e ácido clorídrico (97:3) devido à grande quantidade de ácidos micólicos presente na parede das micobactérias (KK LAHIRI; SK CHATTERJEE, 1994).

Na Figura 3, estão descritos os critérios para leitura e interpretação dos resultados de baciloscopia de escarro recomendado pelo Ministério da saúde.

LEITURA	RESULTADO
Não são encontrados BAAR em 100 campos observados	NEGATIVO
1 a 9 BAAR em 100 campos observados	Relata-se a quantidade de bacilos encontrada
10 a 99 BAAR em 100 campos observados	POSITIVO +
1 a 10 BAAR por campo em 50 campos observados	POSITIVO ++
Em média mais de 10 BAAR por campo em 20 campos observados	POSITIVO +++

Figura 3. Leitura e interpretação dos resultados de baciloscopia de escarro.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2018.

Atualmente esse exame é o mais utilizado para o diagnóstico de TB, por possuir grande facilidade operacional, rapidez e baixo custo, além de apresentar uma boa especificidade em regiões de alta prevalência (PERKINS, 2000). Porém, apresenta baixa sensibilidade, em torno de 25 a 65%, pois para visualização do BAAR são necessárias na amostra quantidades acima de 5.000 - 10.000 bacilos/mL (HOBBY et al., 1973; NORBIS et al., 2013; RYU, 2015).

Quando executada corretamente, a baciloscopia do escarro, permite detectar de 60% a 80% dos casos de TBP em adultos (HOBBY et al., 1973), o que é importante do ponto de vista epidemiológico, considerando que os casos bacilíferos são os responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2019b), mas para diagnóstico de pacientes paucibacilares este exame se torna pouco sensível (BRODIE; SCHLUGER, 2005).

Devido a essas limitações de sensibilidade da técnica, para o diagnóstico definitivo são necessárias outras técnicas com maior sensibilidade como métodos de biologia molecular e exame de cultura (RIBEIRO et al., 1995).

2.3.2 Teste Rápido Molecular para Tuberculose (TRM-TB)

O TRM-TB (Gene Xpert® MTB/RIF, Cepheid, EUA) é um teste rápido de amplificação de ácidos nucleicos por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real que detecta o DNA dos bacilos do complexo MTB e a resistência à rifampicina relacionada a mutação no gene *rpoB*, sendo indicado, prioritariamente, para o diagnóstico de TBP e laríngea em adultos e adolescentes. Para realizar esse teste, necessita-se somente de uma amostra de escarro, e o resultado é liberado em até 3 horas (WHO, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2019b).

A sensibilidade do TRM-TB em amostras de escarro em adultos é superior à da baciloscopia, podendo alcançar 90% para detecção do complexo MTB e 95% para a detecção da resistência a rifampicina. Porém, esse método apresenta alto custo, requer infraestrutura adequada, profissionais qualificados e manutenção contínua dos equipamentos e softwares, condições nem sempre compatíveis com a realidade dos laboratórios de diagnóstico de TB dos países de baixa renda (NORBIS et al., 2013; RYU, 2015).

Essa técnica possui boa sensibilidade e especificidade quando realizada em amostras de pacientes com resultado de baciloscopia positiva. Porém, apresenta resultado de sensibilidade baixo quando testados em amostras com baciloscopia negativa e cultura positiva. (PALOMINO, 2006; BOEHME et al., 2010; LAWN et al., 2013).

2.3.3 Exame de Cultura

A cultura é o exame laboratorial que permite a multiplicação e o isolamento de BAAR a partir da sementeira da amostra clínica, em meios de cultura específicos para micobactérias. É considerado padrão ouro, demanda de 2 a 8 semanas para obtenção de resultados, não requer recursos sofisticados, sendo capaz de detectar entre 10 a 100 bacilos viáveis por mL de espécime clínico (PALOMINO, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008, 2019b; JAIN et al., 2011). Os meios de cultura mais utilizados para o isolamento de micobactérias são o Lowenstein-Jensen (LJ) e o Ogawa-Kudoh (OK), preparados a base de ovo, contendo certa quantidade de glicerol como fonte de carbono e algumas vezes asparagina como fonte de nitrogênio (KENT; KUBICA, 1985).

A cultura, quando realizada no escarro pode adicionar 20% de casos ao total daqueles confirmados somente pela baciloscopia. Em pacientes sem doença cavitária a sensibilidade é de 70%, podendo chegar em até 96% em pacientes com lesão cavitária com especificidade de 98% (GREENBAUM et al., 1980; SCHIRM et al., 1995).

Além disso, permite a realização do teste de sensibilidade a diversos fármacos e viabiliza a realização de várias técnicas de biologia molecular, pois isola o microrganismo, podendo ser utilizado posteriormente com finalidade epidemiológica. Sua principal limitação está relacionada ao período prolongado de incubação decorrente do elevado tempo de geração do MTB, que pode se estender por até três semanas (KUMAR et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008; PALACI et al., 2013; ASMAR; DRANCOURT, 2015).

A contaminação dos meios de cultura também pode constituir um sério inconveniente para o diagnóstico, segundo dados do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose de 2008 a taxa de contaminação aceitável dos meios de

cultura sólidos para micobactérias deve estar entre 3 e 5% (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). Entretanto, essa meta nem sempre é alcançada em todos os laboratórios que realizam diagnóstico de TB, fato evidenciado por um estudo realizado por Kassaza e colaboradores, no laboratório do Epicenter Research Center em Mbarara, Uganda, que revelou uma taxa de contaminação de 31% em meio sólido LJ, muito maior que o limite recomendado (KASSAZA et al., 2014).

Existem também os meios de cultura líquidos, como o Middlebrook 7H9 que é utilizado no sistema automatizado BD BACTEC™ MGIT™ 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton & Dickinson, EUA) (CHEW et al., 1998; FURIN; JOHNSON, 2005). Estudos de revisão sistemática demonstraram que os meios de cultura líquidos quando utilizados nos equipamentos MGIT e Bact/Alert 3D são mais rápidos e sensíveis para detecção de MTB em espécimes clínicos do que os meios de cultura sólidos. O MGIT é mais sensível (88%) quando comparado ao meio de cultura sólido (76%), além de reduzir o tempo de obtenção de resultados de testes de sensibilidade à droga de 42 para 28 dias (CRUCIANI et al., 2004). Entretanto, meios de cultura líquidos apresentam algumas limitações como maior propensão à contaminação por outros microrganismos ou outras micobactérias (que não tem importância clínica) e possibilidade de contaminação cruzada entre amostras durante o processamento e inoculação. Por esses motivos, a implantação das instalações do laboratório onde serão realizadas as culturas deve dar ênfase a equipamentos de biossegurança, treinamento, supervisão e controle de qualidade externo para seu funcionamento correto (RODRIGUES; VADWAI, 2012).

2.3.3.1 Amostras Clínicas

As amostras clínicas devem preencher uma série de condições para um diagnóstico eficaz: indicação correta da pesquisa de micobactérias, seleção do tipo de amostra mais representativa, cuidado na coleta, transporte, acondicionamento e recepção das amostras. Todos os profissionais envolvidos nessas etapas, desde a coleta até o processamento das amostras, devem possuir treinamentos de qualidade, incluindo aspectos de biossegurança, a fim de minimizar riscos de contaminação e acidentes no laboratório (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008).

As amostras de escarro devem ser coletadas em pote plástico estéril de boca larga, e para o exame de cultura devem ser transportadas sob refrigeração (2 - 8°C) e processadas no prazo de 24 a 48 horas quando provenientes de centros de coleta distantes do laboratório (GLOBAL LABORATORY INITIATIVE, 2014). Essas condições, quando obedecidas, contribuem para a redução da taxa de contaminação das culturas, diminuem a perda de viabilidade para a cultura e características para a baciloscopia.

A fim de diminuir os interferentes da contaminação, as amostras não-estéreis devem passar por processo de descontaminação antes da realização do cultivo para o diagnóstico de TB. Esta etapa é essencial para o isolamento de BAAR, pois permite a eliminação da microbiota associada que cresce mais rapidamente que as micobactérias, contaminando o meio de cultura, afetando sua viabilidade e impedindo a multiplicação dos bacilos (KENT; KUBICA, 1985; ASMAR et al., 2016).

Listamos abaixo algumas das metodologias de descontaminação mais utilizadas atualmente na rotina de processamento de amostras dos laboratórios de diagnóstico do Brasil.

2.3.3.1.1 Método Petroff Modificado

O método de Petroff modificado utiliza hidróxido de sódio (NaOH) 4% como agente de fluidificação/descontaminação, é o método padrão para realizar a descontaminação das amostras, sendo utilizado o meio de cultura sólido LJ para semeadura, porém trata-se de um método que requer muitas etapas e com tempo de execução elevado, necessitando de centrífuga refrigerada e cabine de segurança biológica. Apesar de ser o recomendado pelo Ministério da Saúde para isolamento do bacilo, o método Petroff modificado demanda um tempo de aproximadamente 15 minutos em contato o agente descontaminante NaOH, tornando-se um procedimento altamente drástico para as micobactérias (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008; COSTA et al., 2018).

2.3.3.1.2 Método N-Acetil-L-Cisteína-Hidróxido de Sódio (NALC/NaOH)

O método NALC/NaOH utiliza como agente mucolítico o N-acetil-L-cisteína (NALC) e como agente descontaminante o NaOH a 2%. O método também utiliza o citrato de sódio a 1,45% que tem como função sequestrar os íons de metais que uma vez presentes nas amostras clínicas podem inativar a NALC. Além disso, essa solução mucolítica/descontaminante é compatível com todos os meios de cultura, sendo recomendado para todas as amostras clínicas, principalmente as paucibacilares (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008).

2.3.3.1.3 Método Ogawa-Kudoh (OK)

Esse método é indicado para amostras de escarro espontâneo (EE), um método simplificado para descontaminação, de execução rápida e fácil durando aproximadamente de 3 a 4 minutos. No processamento de amostras, não necessita o uso de cabine de segurança biológica e dispensa o uso de centrífuga, considerado assim, um método econômico (PALACI et al., 2013). Como agente descontaminante utiliza-se o NaOH 4% (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008; COSTA et al., 2018).

Apesar da exposição com o descontaminante ser em tempo menor comparado com outros métodos, ele continua sendo bastante prejudicial para o crescimento de micobactérias, afetando a viabilidade de MTB. Estudos demonstram que este método pode eliminar até 60% dos bacilos presentes nas amostras biológicas (PETROFF, 1915; KUBICA, 1962; ASMAR; DRANCOURT, 2015).

Diante disso, pode-se obter resultados falso-negativos para MTB em exames realizados de pacientes paucibacilares, como pacientes portadores do HIV (SWAI et al., 2011).

2.3.3.2 Descontaminação com Clorexidina

A clorexidina (CHX) é um descontaminante que possui um amplo espectro de atividade contra bactérias, atuando na desorganização geral e inibição específica de enzimas da membrana celular, possuindo efeito mínimo sobre a viabilidade de

micobactérias. A CHX tem se mostrado um excelente agente antimicrobiano, atuando com amplo espectro de atividade contra bactérias gram + e gram – (DENTON,1991; GROSSMAN et al., 1986).

Métodos de descontaminação baseado no uso da CHX tem sido proposto para o isolamento de micobactérias, sendo baratos, rápidos e de fácil de execução. O método de descontaminação com CHX possui menor taxa de contaminação quando comparado com o método padrão que utiliza NALC-NaOH. Portanto, esse método é uma alternativa viável para a descontaminação de amostras de escarro e o isolamento de MTB em países com pouco recurso (FERRONI et al., 2006; GITTEH et al., 2016).

2.3.3.3 Descontaminação com OMNIGene®

Com a escassez de amostras transportadas nas condições ideais e considerando que os espécimes são frequentemente transportados em ambientes de alta temperatura e alta umidade, formas alternativas eficazes e acessíveis de transporte de amostras são necessárias para manutenção da integridade das amostras melhorando a detecção de pacientes com MTB e diminuindo as taxas de contaminação de culturas (MAHARJAN et al., 2016; AZAM et al., 2018).

Uma alternativa existente no mercado é o OMNIGene®, que é um reagente utilizado para otimização de amostras de TB destinado à liquefação e descontaminação de escarros frescos ou congelados, mantendo a viabilidade do MTB. Este reagente permite o transporte e o armazenamento de escarro durante 8 dias entre 4°C e 40°C.

Asandem (2018) demonstrou que o OMNIGene® é efetivo em inibir o crescimento de contaminantes microbianos no escarro e manter a viabilidade das micobactérias mesmo após os 8 dias recomendados, embora com positividade tardia. As amostras tratadas com OMNIGene® também foram compatíveis com a análise do Xpert MTB / RIF (ASANDEM et al., 2018).

2.4 JUSTIFICATIVA

Vários protocolos foram propostos para limitar o crescimento excessivo de contaminantes com a utilização do NaOH, incluindo os métodos de OK e o método

NALC-NaOH. Ambos os métodos são amplamente utilizados para a descontaminação, no entanto o NaOH pode afetar a viabilidade de MTB matando até 60% dos bacilos em espécimes clínicos, levando assim a resultados falsos negativos, principalmente em casos de infecção paucibacilar, como observado em pacientes infectados pelo HIV (KUBICA, 1962; KASSAZA et al., 2014).

As taxas de contaminação em alguns laboratórios de rotina para o diagnóstico da TB têm sido superior ao recomendado pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). Peres e colaboradores (2011) demonstraram uma tendência a diminuição nesta taxa em culturas sólidas inoculadas com amostras de EE coletadas após o enxague oral com CHX e descontaminadas pelo método de NALC-NaOH quando comparadas a aquelas coletadas após o enxague oral com água. Quanto a inoculação em meio líquido, houve uma redução significativa de 12% na taxa de contaminação (PERES, R. et al., 2011).

Considerando que a cultura é o único método que, permite: (i) o isolamento e identificação de todas as espécies de micobactérias de importância clínica humana, (ii) a realização de testes de sensibilidade (qualitativo e quantitativo) a todas os fármacos utilizados no tratamento da TB, (iii) o monitoramento da resposta terapêutica, (iv) prever o risco de recidiva (cultura positiva no segundo mês de tratamento) (v) a caracterização genotípica do *M. tuberculosis* e de outras espécies do gênero torna-se absolutamente necessário o desenvolvimento e avaliação de métodos de descontaminação para o exame de cultura de micobactérias.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar novos métodos diretos de digestão/descontaminação de escarro para cultura de micobactérias.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a interferência da CHX na viabilidade de *M. tuberculosis*;
- 2) Avaliar a descontaminação de amostras de escarro por intermédio das seguintes substâncias: CHX (0,5%, 0,7% e 0,9%), OMNIGene® e NaOH 4% e realizar modificações técnicas com intuito de melhorar a eficiência destes métodos;
- 3) Avaliar se a adição de um processo de fluidificação das amostras de escarro previamente à descontaminação com CHX 0,7% e com OMNIGene® diminui a taxa de contaminação;
- 4) Avaliar o processo simultâneo de fluidificação e descontaminação com CHX 7% das amostras de escarro, com posterior etapa de neutralização;
- 5) Avaliar a descontaminação de amostras de escarro com OMNIGene® após exposição por diferentes tempos.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA DO ESTUDO

4.1.1 Delineamento

Trata-se de um estudo experimental que visa avaliar um novo método de digestão/descontaminação para diagnóstico da TB

.

4.1.2 Modelo de estudo

Estudo transversal prospectivo de caráter experimental comparativo de métodos.

4.1.3 Local

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

4.1.4 Desenho

O presente estudo foi dividido em três fases. A primeira fase consistiu na padronização da concentração da solução de CHX com a finalidade de analisar qual seria a mais adequada a ser utilizada no processamento de amostras de EE para diagnóstico da TB obtendo um melhor isolamento de micobactérias e menor taxa de contaminação das culturas. Os testes da primeira fase foram realizados em triplicata e em comparação com o tratamento das amostras com NaOH 4% pelo método de OK.

A segunda fase consistiu no processamento de amostras de EE com a concentração de CHX definida na primeira fase, em diferentes tempos de exposição (2, 5 e 15 minutos) e na utilização do descontaminante comercial OMNIGene® (15, 30 e 45 minutos) para analisar a taxa de contaminação de culturas em comparação com método OK.

Em seguida, na terceira fase foram feitas modificações necessárias para otimização dos testes desenvolvidos.

4.2 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram utilizadas amostras de EE de pacientes com suspeita de TBP processadas somente após a realização dos métodos de diagnóstico de rotina pelo Laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES.

4.2.1 Critérios de Inclusão

- Amostra de paciente previamente cadastrado no banco de dados eletrônico denominado *TB Notes*, provenientes do município de Cariacica-ES, com suspeita de TBP;
- Amostra liberada para descarte pela rotina do laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES;
- Amostras com volume mínimo de 1 mL.

4.2.2 Critérios de Exclusão

- Amostras de paciente em tratamento de TBP.

4.2.3 Fluxograma de seleção

O Laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES, em parceria com a Secretaria de Estado de Saúde do Espírito Santo, presta serviço de diagnóstico de TB e Micobacterioses para a comunidade capixaba. Portanto, rotineiramente, amostras de EE provenientes do município de Cariacica chegam ao laboratório onde são processadas para diagnóstico, que consiste na realização de um esfregaço direto em lâmina para baciloscopia (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008) e de um exame de cultura em meio OK através do método de descontaminação de OK com NaOH 4% (KUDOH; KUDOH, 1974; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008).

Após fixação do esfregaço, a lâmina é corada pela técnica de Auramina-O para baciloscopia em microscópio de fluorescência, enquanto que as culturas são incubadas a 37° C e avaliadas semanalmente por um período máximo de 6 semanas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) é quantificado utilizando os padrões de interpretação nacionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). Uma cultura é considerada contaminada em meio sólido quando é observada macroscopicamente na superfície a presença de microrganismos contaminantes (como fungos ou outras bactérias) e confirmada microscopicamente pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen. As culturas que tem a superfície apenas parcialmente contaminada, continuam sendo observadas até o período máximo de 6 semanas. Após esse período, as culturas que não apresentaram nenhum crescimento micobacteriano e que não contaminaram completamente são consideradas negativas (KENT e KUBICA, 1985).

Para não interferir no diagnóstico dos pacientes, a seleção das amostras para realização dos exames do projeto foi realizada após a liberação das amostras pela rotina do Laboratório. Isso foi possível, pois o restante da amostra sempre é armazenado sob refrigeração (2 – 8°C) por até 3 dias após a realização dos procedimentos de diagnóstico. Portanto, as amostras só foram selecionadas para o estudo com base nos critérios de inclusão e exclusão após liberação dos resultados de baciloscopia no sistema NOTES, em no máximo 72 horas (Figura 4).

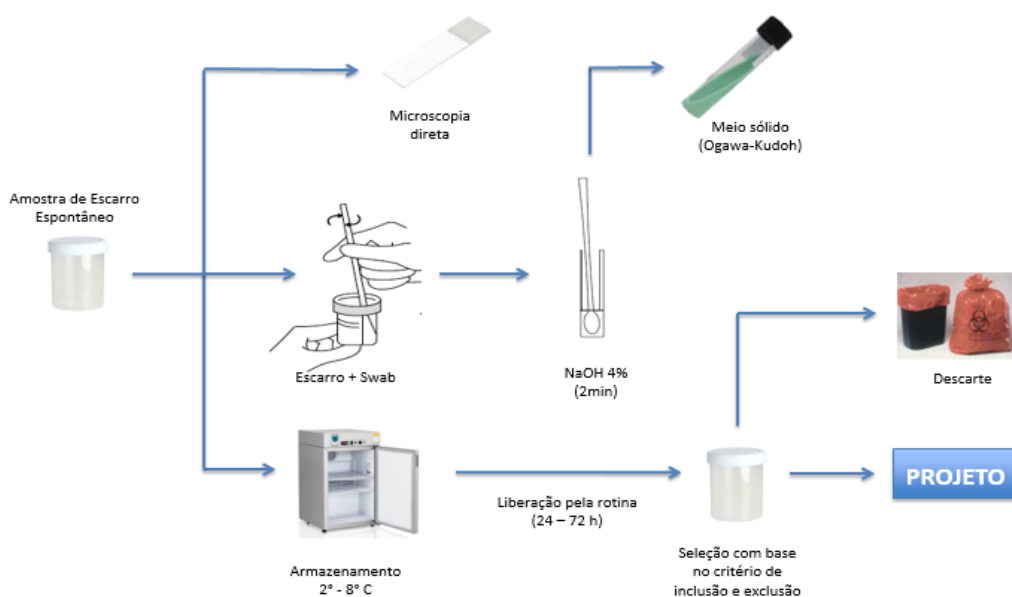


Figura 4. Fluxograma de seleção de amostra.

4.3 ENSAIOS LABORATORIAIS

4.3.1 Ação dos descontaminantes sobre o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*

4.3.1.1 Isolamento nos métodos diretos de descontaminação

Nesse ensaio, foi preparada uma suspensão micobacteriana com cepa de referência de MTB H37Ra (ATCC 25177) com turbidez equivalente ao padrão 1,0 da escala McFarland, com densidade óptica (D.O.) de 0,320 em um comprimento de onda de 625nm (Espectrofotômetro Microprocessado Visível Digital Bivolt modelo Q 798DRM, Quimis, Brasil). Após a obtenção da suspensão, foram realizadas diluições seriadas de 10, 100, 1000, 10000, 100000 e 1000000 vezes em tubos de hemólise, transferindo-se 0,3mL da diluição anterior para 2,7mL de água. Em seguida, colocou-se um swab estéril comercial em cada uma das diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) durante 10 segundos e logo após colocou-se cada swab em soluções de NaOH 4% (método de OK). Manteve-se durante 2 minutos, então retirou-se o excesso do descontaminante na parede do tubo de hemólise e semeou-se em meio de cultura de OK de forma suave em todas as direções na placa de petri (três direções), procurando abranger toda a superfície. O mesmo procedimento foi repetido para CHX 0,2%, 0,5% e 0,7% (Figura 9). Como controle do ensaio, o mesmo procedimento foi realizado substituindo o descontaminante por água deionizada estéril.

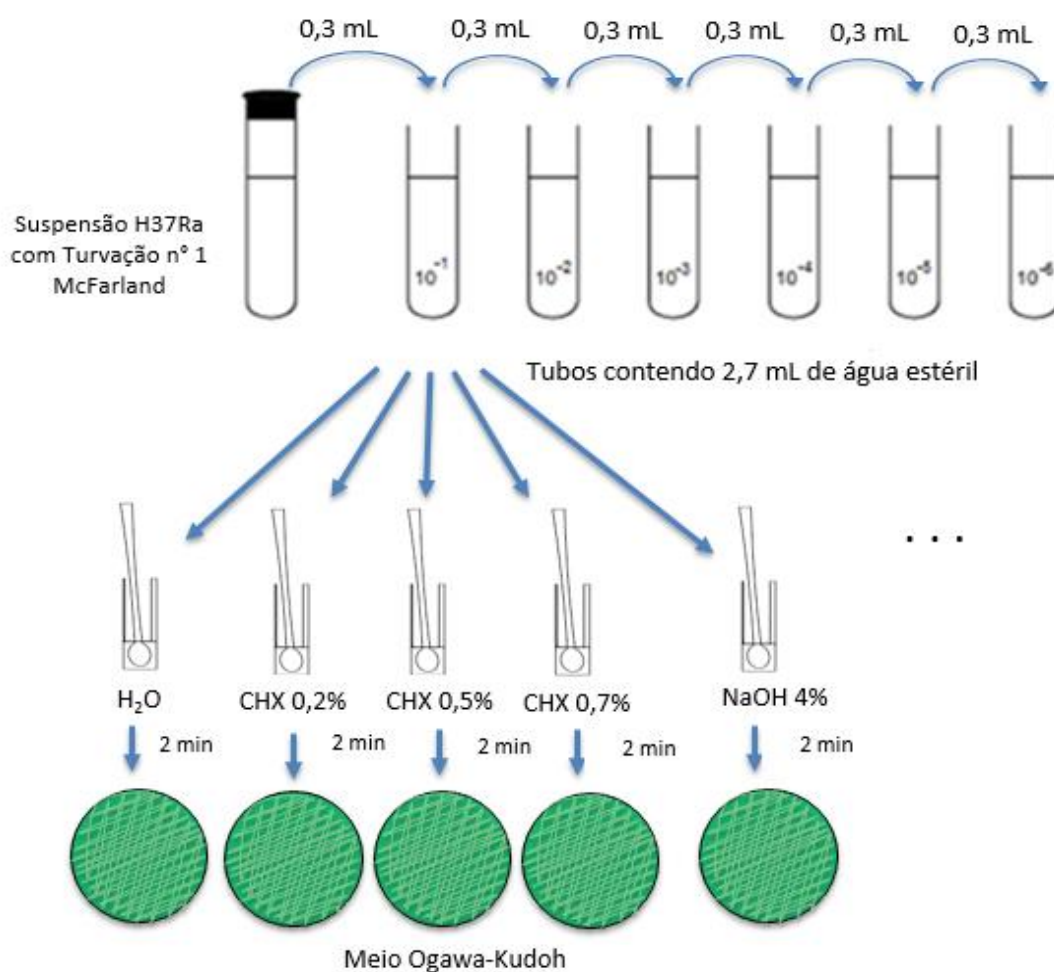


Figura 9. Esquema do ensaio de isolamento de *Mycobacterium tuberculosis* após exposição a CHX em diferentes concentrações e NaOH 4%.

4.3.1.2 Leitura após incubação

Após a inoculação, as placas com meio de cultura foram incubadas em estufa 37°C, até 28 dias, com leituras semanais. Foi realizada contagem macroscópica do número de UFC, com auxílio de lupa na superfície do meio das placas após 21 e 28 dias de incubação. Posteriormente, calculou-se a média do número de colônias obtidas nos três experimentos.

4.3.2 Descontaminação de amostras pelos métodos diretos

4.3.2.1 Descontaminação pelo método de Ogawa-Kudoh

O método de OK utiliza swab de algodão que, após ser embebido na parte purulenta do escarro, é colocado em tubo de hemólise contendo 3mL de NaOH 4% por 2 minutos para descontaminação e posterior semeadura em meio de OK (Figura 5). Este é o método direto recomendado pelo Ministério da Saúde para processamento de amostras de EE (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008) e foi utilizado como método padrão para comparação em todos os experimentos realizados.

4.3.2.2 Descontaminação com Clorexidina

No método proposto inicialmente para descontaminação com CHX, avaliamos simultaneamente três concentrações diferentes (0,5%, 0,7% e 0,9%). Para tal teste, foram utilizados três swabs estéreis de algodão, que foram embebidos na parte purulenta de cada amostra de escarro. Em seguida, de forma randomizada, cada swab foi colocado em um tubo de hemólise contendo 3mL de uma das soluções de CHX (0,5%, 0,7% ou 0,9%) por 2 minutos para descontaminação e posterior semeadura em meio de OK (Figura 5).

4.3.2.3 Descontaminação com OMNIGene®

Neste método de descontaminação, foi adicionado o OMNIGene® em volume igual ao do escarro contido em um tubo graduado de 50mL. Em seguida, a mistura foi homogeneizada 20 vezes por inversão e deixada em repouso à temperatura ambiente. Após 30 minutos, utilizou-se um swab de algodão estéril que foi embebido no homogeneizado, para semear em meio OK (Figura 5).

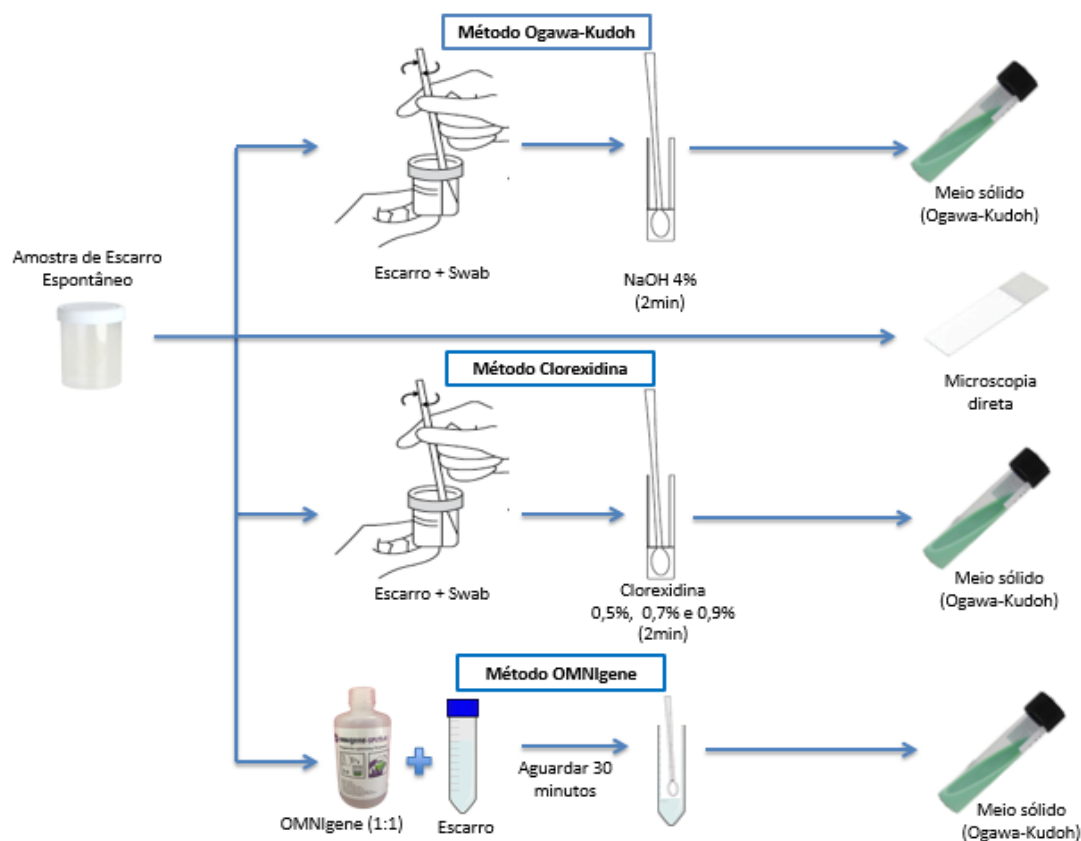


Figura 5. Esquema para realização de descontaminação das amostras utilizando os métodos diretos OK, CHX e OMNIGene®.

4.3.3 Descontaminação de amostras pelos métodos diretos modificados

4.3.3.1 Fluidificação para descontaminação com Clorexidina 0,7% e OMNIGene®

Para a obtenção de amostras mais homogêneas visando melhorar o processo de descontaminação, elas foram transferidas para tubos estéreis de polipropileno, com capacidade de 50 mL e seu volume medido, para realização de etapa prévia de fluidificação do escarro. Para tal, adicionou-se 10-15 pérolas de vidro e submeteu-se a agitação intensa por 20 segundos em agitador mecânico (Scientific Industries / Vortex Genie 2), seguida por repouso durante 15 minutos, com agitação intensa por 15 a 20 segundos a cada 5 minutos.

Para descontaminação com CHX 0,7%, três swabs estéreis de algodão foram embebidos na amostra homogeneizada e colocados, cada um, em um respectivo tubo contendo 3 mL de CHX 0.7%. Cada swab ficou descontaminando por um tempo

específico (2, 5 e 15 minutos), para posteriormente serem semeados em meio OK (Figura 8).

Para descontaminação utilizando o OMNIGene®, após a etapa de fluidificação, outros três swabs estéreis de algodão foram embebidos na amostra homogeneizada e colocados, cada um, em um respectivo tubo contendo 3 mL de OMNIGene®. Cada swab ficou descontaminando por um tempo específico (15, 30 e 45 minutos), para posteriormente serem semeados em meio OK (Figura 6).

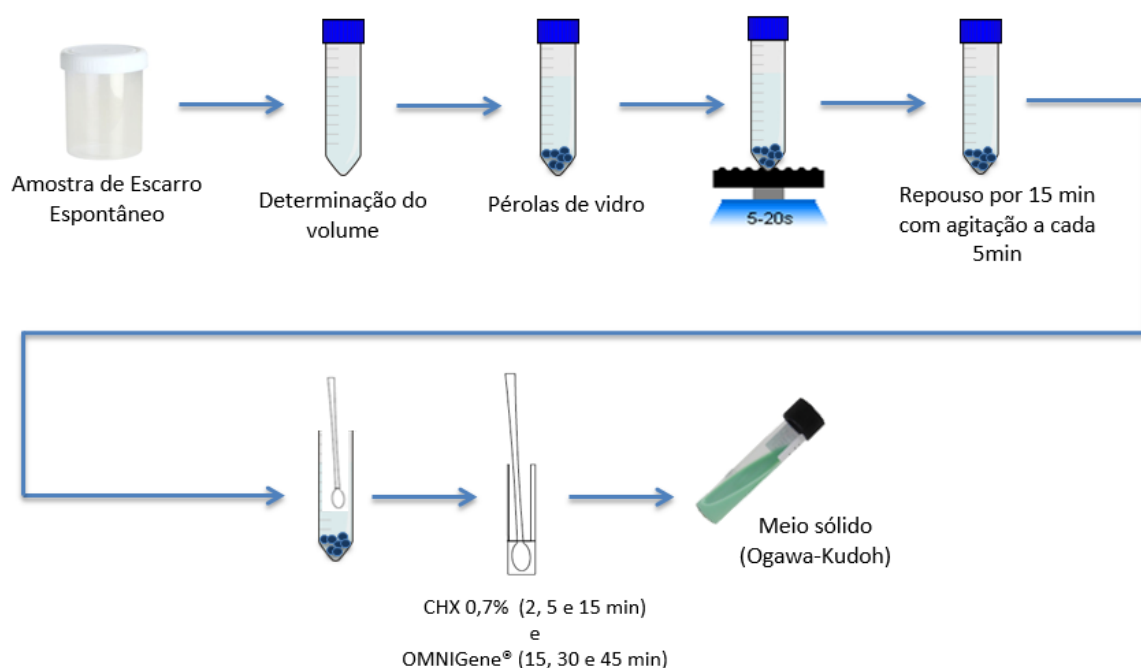


Figura 6. Esquema da inclusão da etapa de fluidificação das amostras para posterior descontaminação utilizando CHX 0,7% e OMNIGene®.

4.3.3.2 Processamento das amostras pela adição de Clorexidina 7%

Neste ensaio procedeu-se a fluidificação simultaneamente à descontaminação. As amostras foram transferidas para tubos estéreis de polipropileno, com capacidade de 50 mL e seu volume medido. Foram utilizadas de 10-15 pérolas de vidro e, nesta etapa foi adicionada uma solução de CHX 7% na proporção de 1:10 da amostra (correspondendo a uma concentração final de CHX na mistura de 0,7%). Em seguida a amostra foi submetida a agitação intensa por 20 segundos em agitador mecânico (Scientific Industries / Vortex Genie 2), seguida por repouso durante 15 minutos, com agitação intensa de 15 a 20 segundos a cada 5 minutos. Logo após, foi acrescentada

uma etapa de neutralização da CHX antes da inoculação em meio OK, que consistiu em embeber um swab na amostra descontaminada e, em seguida, imergi-lo por 5 minutos em um tubo contendo 3 mL de solução tampão (Lecitina 0,3%, Tween 80 1%, PBS pH 6,8). Posteriormente, o swab foi semeado em meio OK (Figura 7).

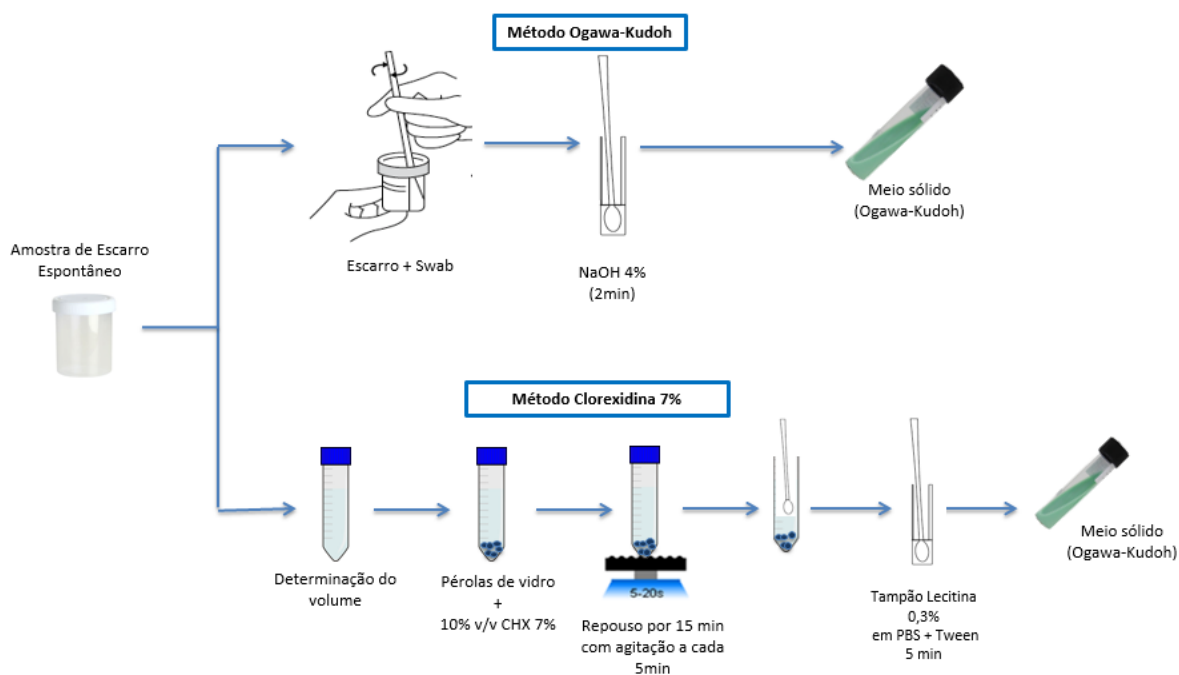


Figura 7. Esquema da fluidificação e neutralização para descontaminação com adição de CHX 7%.

4.3.3.3 Descontaminação utilizando OMNIGene® em diferentes tempos

Neste ensaio de descontaminação, foi adicionado o OMNIGene® em volume igual ao do escarro contido em um tubo graduado de 50mL. Em seguida, a mistura foi homogeneizada 20 vezes por inversão e deixada em repouso à temperatura ambiente. Ao longo de 24 horas, em cada um dos pontos definidos (1 hora, 2 horas e 24 horas), utilizou-se um swab de algodão estéril que foi embebido no homogeneizado, para semear em meio OK (Figura 8).

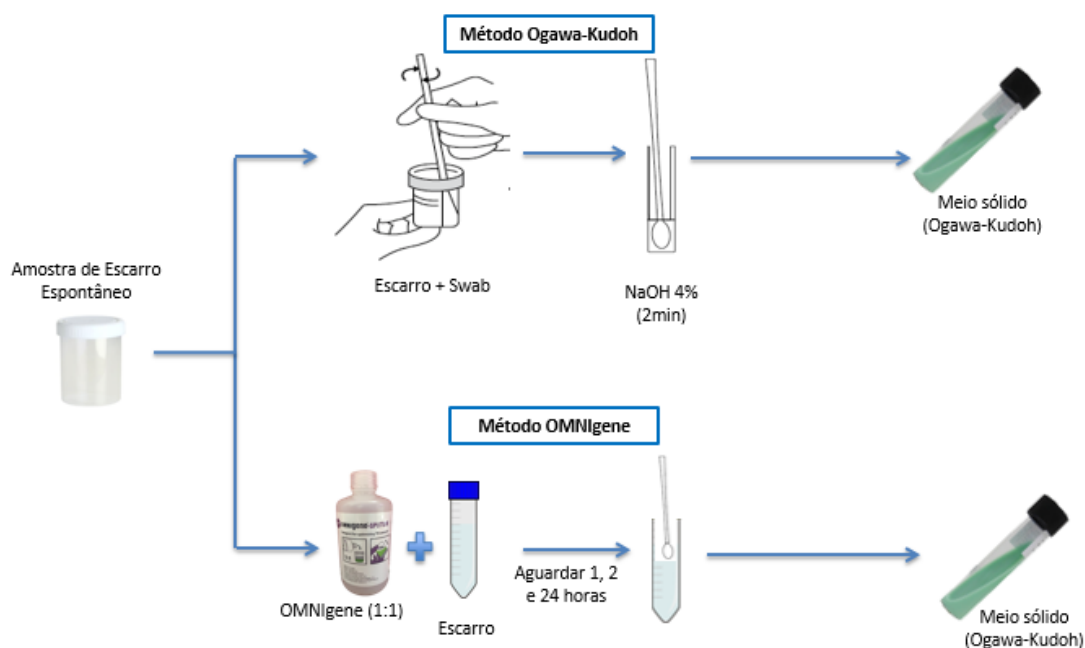


Figura 8. Esquema para realização de descontaminação das amostras utilizando OMNIGene® em diferentes tempos.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados foram analisados utilizando-se o programa EPI INFO™. Para análise dos dados de taxas de contaminação e isolamento de micobactérias, foi utilizado o teste exato de Fisher, devido as baixas frequências observadas, considerando-se o intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. Além disso, também foi considerado o cálculo do *Odds Ratio* (OR).

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências de Saúde (CEP local), em outubro de 2017, sob o protocolo C.A.A.E: 76467617.2.0000.5060.

A dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi justificada pois as amostras foram somente utilizadas após a realização dos métodos de diagnóstico de rotina do laboratório.

Resultados

5. RESULTADOS

O presente capítulo foi dividido em 3 seções: **1)** ação dos descontaminantes sobre o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*; **2)** processamento de amostras pelos métodos diretos (método OK, método CHX, método OMNIGene®); **3)** processamento de amostras pelos métodos diretos modificados: i) descontaminação de amostras utilizando CHX e OMNIGene® após digestão mecânica; ii) processamento das amostras pela adição de CHX 7%; iii) descontaminação de amostras utilizando OMNIGene® em 24 horas; iv) descontaminação de amostras utilizando OMNIGene® em diferentes tempos.

5.1 AÇÃO DOS DESCONTAMINANTES SOBRE O CRESCIMENTO DE *Mycobacterium tuberculosis*

5.1.1 Isolamento nos métodos diretos de descontaminação

O teste da ação da CHX sobre o crescimento de MTB H37Ra ATCC 25177 demonstrou diferenças no isolamento de acordo com as concentrações (0,2%, 0,5% e 0,7%) comparadas com a H₂O e o método padrão que utiliza o NaOH 4%.

Na Figura 10, comparado ao controle (H₂O), nota-se que após descontaminação com NaOH 4% há uma redução visível no número de colônias isoladas no meio de cultura. Em relação à CHX, apesar de também apresentar uma redução no número de colônias isoladas em relação ao controle, observou-se um maior isolamento em relação ao NaOH 4%. Observou-se também que quanto maior a concentração de CHX utilizada, maior o isolamento de colônias de MTB no meio de cultura.

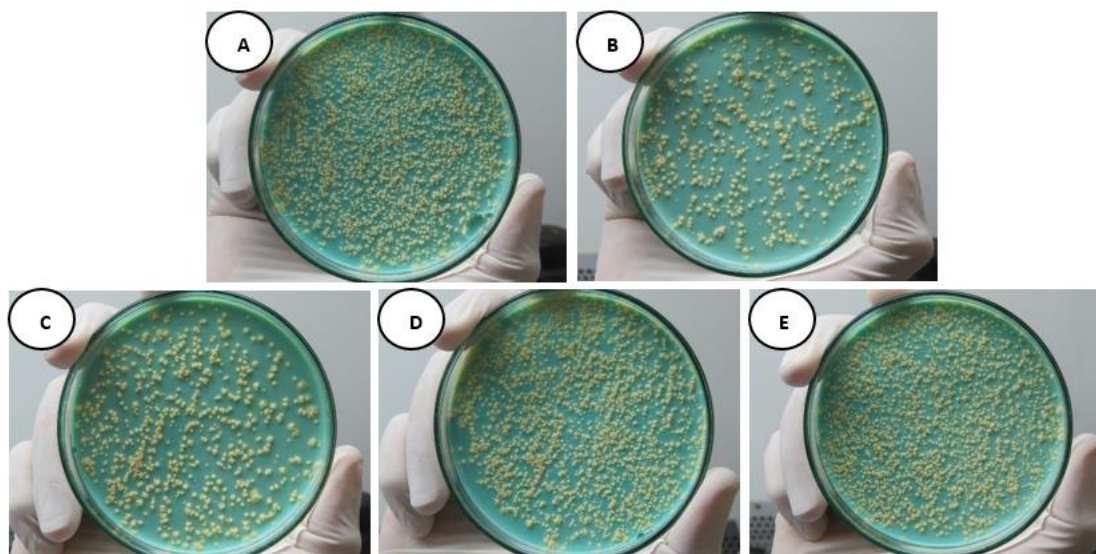


Figura 10. Ação dos descontaminantes NaOH e CHX sobre o crescimento de MTB H37Ra ATCC 25177.

Leitura da diluição 10^{-2} com 31 dias de incubação a 37°C após: A) Descontaminação com H_2O ; B) Descontaminação com NaOH 4%; C) Descontaminação com CHX 0,2%; D) Descontaminação com CHX 0,5%; E) Descontaminação com CHX 0,7%.

Na Tabela 1 estão demonstradas as médias das contagens do número de UFC dos resultados obtidos com as soluções de NaOH 4% e CHX 0,2%, 0,5% e 0,7%. Observou-se que o aumento da concentração da solução de CHX não afetou o crescimento de micobactérias, quando comparado com o controle (água deionizada).

Tabela 1. Ação dos descontaminantes sobre o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*.

Diluição		Descontaminantes				
		H_2O	NaOH 4%	CHX 0,2%	CHX 0,5%	CHX 0,7%
Nº UFC	10^{-1}	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc
	10^{-2}	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc
	10^{-3}	336	131	204	216	255
	10^{-4}	25	7	45	30	45
	10^{-5}	3	5	2	1	2
	10^{-6}	0	0	0	0	0

H_2O = água deionizada estéril; NaOH = hidróxido de sódio; CHX = clorexidina; Inc = incontável.

5.2 DESCONTAMINAÇÃO DE AMOSTRAS PELOS MÉTODOS DIRETOS

Foram arrolados neste estudo 43 pacientes com suspeita de TBP. Cada paciente forneceu, duas amostras de EE, totalizando 86 amostras. Todas as amostras foram inicialmente processadas pelo método de OK para controle e, em seguida, de forma randomizada, uma amostra de cada paciente foi descontaminada com as diferentes concentrações de CHX (Figura 11) e as outras amostras foram processadas utilizando o OMNIGene® (Figura 12). As amostras descontaminadas pelo OMNIGene® não podiam ser reaproveitadas, pois todo o volume das amostras era utilizado, diferente dos outros métodos, nos quais apenas uma pequena porção das amostras era utilizada.

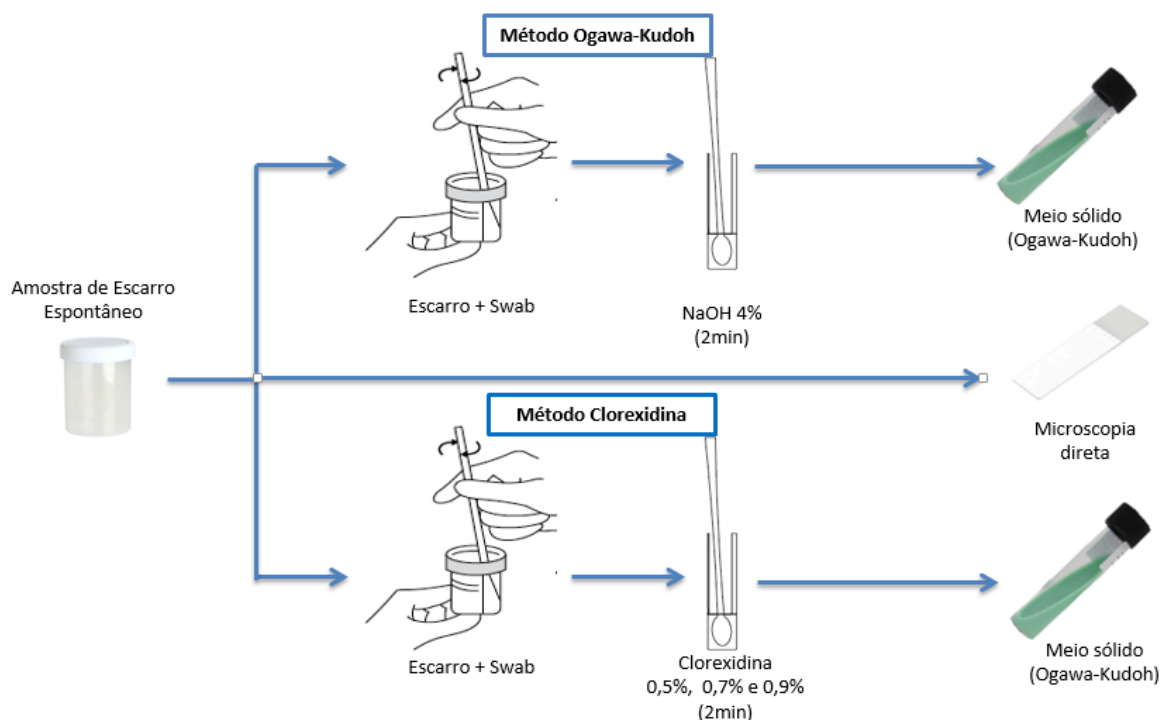


Figura 11. Avaliação da descontaminação de amostras de escarro com NaOH e CHX.

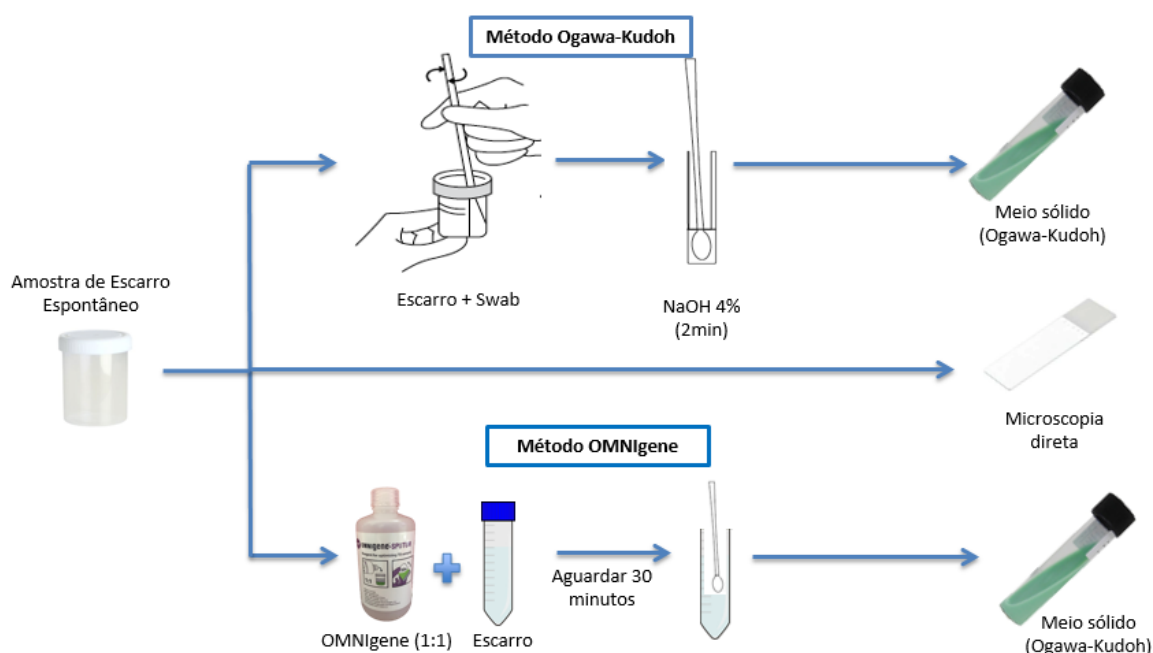


Figura 12. Avaliação da descontaminação de amostras de escarro com NaOH e OMNIGene®.

Estes testes (Tabela 2) demonstraram que a taxa de contaminação utilizando NaOH 4% (método OK) foi de 9,3% e com a solução de OMNIGene® foi de 13,9%. Por outro lado, a taxa de contaminação utilizando a CHX 0,5%, 0,7% e 0,9% foi pelo menos cinco vezes maior que com o método de referência. Observamos também que as taxas de positividade de 7,0% com CHX 0,5%, e de 4,7% com CHX 0,7% e também com CHX 0,9% foram menores do que a do respectivo controle com NaOH 4% (método OK) que foi de 11,6%. Por outro lado, a descontaminação com OMNIGene® apresentou uma taxa de positividade de 16,3%, quase o dobro do controle com o método de referência utilizado (9,3%).

Tabela 2. Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização de descontaminação das amostras utilizando os Métodos Diretos OK, CHX e OMNIGene®.

SOLUÇÃO	N	NEG n (%)	POS n (%)	CC n (%)	FISHER p valor	OR
NaOH 4%	43	34 (79,1)	5 (11,6)	4 (9,3)	-	-
CHX 0,5%	43	18 (41,8)	3 (7,0)	22 (51,2)	0,0174	9,17
CHX 0,7%	43	18 (41,8)	2 (4,7)	23 (53,5)	0,0074	14,38
CHX 0,9%	43	22 (51,1)	2 (4,7)	19 (44,2)	0,0138	11,88
NaOH 4%	43	35 (81,4)	4 (9,3)	4 (9,3)	-	-
OMNIGene®	43	30 (69,8)	7 (16,3)	6 (13,9)	1,0000	0,8571

N = total de culturas; NEG = culturas negativas; POS = culturas positivas (culturas que apresentaram crescimento de bacilo álcool-ácido resistente); CC = culturas contaminadas; FISHER *p* valor e OR (Odds Ratio) = análise relacionada ao número de culturas POS e CC dos grupos em relação ao NaOH 4%.

5.3 DESCONTAMINAÇÃO DE AMOSTRAS PELOS MÉTODOS DIRETOS MODIFICADOS

5.3.1 Fluidificação para descontaminação com Clorexidina 0,7% e OMNIGene®

Nesse processo foram selecionados 20 pacientes com suspeita de TBP, sendo duas amostras de EE por paciente, totalizando 40 amostras. Todas as amostras foram inicialmente processadas pelo método de OK para controle. Logo após, as amostras foram descontaminadas, após a etapa de fluidificação, utilizando a CHX 0,7% em variados tempos (2, 5 e 15 min) e o OMNIGene® (15, 30 e 45 min) (Figura 13).

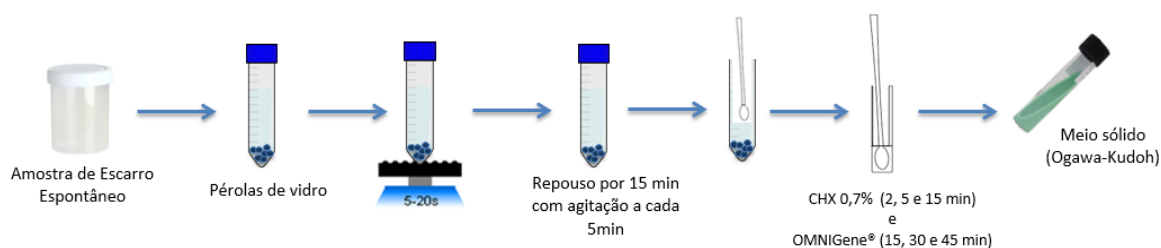


Figura 13. Avaliação da descontaminação e isolamento de micobactérias em amostras de escarro após digestão mecânica e exposição a CHX e OMNIGene® em diferentes intervalos de tempo.

Os resultados (Tabela 3) demonstram que a taxa de contaminação após processamento com CHX 0,7% e com OMNIGene® é inversamente proporcional ao tempo de exposição. Por outro lado, observa-se uma relação diretamente proporcional entre o isolamento e o tempo de exposição.

A taxa de contaminação do método de referência (método OK - NaOH 4%) foi de 5,0% com 27,5% de taxa de positividade (isolamento). Por sua vez, após o uso de OMNIGene®, as taxas de contaminação variaram entre 10,0% e 15,0%, e as de positividade entre 25,0% e 32,5%. Em relação ao uso de CHX 0,7%, a taxa de contaminação variou entre 7,5% e 20,0% e a de positividade entre 0,0% e 17,5%.

Tabela 3. Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização da etapa de fluidificação (CHX e OMNIGene®) e posterior descontaminação das amostras utilizando os Métodos Diretos CHX e OMNIGene®.

SOLUÇÃO	N	NEG n (%)	POS n (%)	CC n (%)	FISHER p valor	OR
NaOH 4%	40	27 (67,5%)	11 (27,5%)	2 (5,0%)	-	-
CHX 0,7% (2 min)	40	32 (80,0%)	0 (0,0%)	8 (20,0%)	0,0002	-
CHX 0,7% (5min)	40	31 (77,5%)	2 (5,0%)	7 (17,5%)	0,0073	19,25
CHX 0,7% (15 min)	40	30 (75,0%)	7 (17,5%)	3 (7,5%)	0,6175	2,36
OMNIGene® (15 min)	40	24 (60,0%)	10 (25,0%)	6 (15,0%)	0,2378	3,30
OMNIGene® (30 min)	40	22 (55,0%)	13 (32,5%)	5 (12,5%)	0,6672	2,11
OMNIGene® (45 min)	40	25 (62,5%)	11 (27,5%)	4 (10,0%)	0,6546	2,00

N = total de culturas; NEG = culturas negativas; POS = culturas positivas (culturas que apresentaram crescimento de bacilo álcool-ácido resistente); CC = culturas contaminadas; FISHER p valor e OR (Odds Ratio) = análise relacionada ao número de culturas POS e CC dos grupos em relação ao NaOH 4%.

5.3.2 Processamento das amostras pela adição de Clorexidina 7%

Nesse ensaio, foram selecionadas 51 amostras de pacientes com suspeita de TBP. Todas as amostras foram inicialmente processadas pelo método de OK para controle. Posteriormente, as amostras foram descontaminadas, após etapa de fluidificação, adicionando-se a CHX 7% na proporção 1:10 da amostra (15 min), seguida de etapa de neutralização com tampão de Lecitina 0,3% em PBS+Tween 80 (Figura 14).

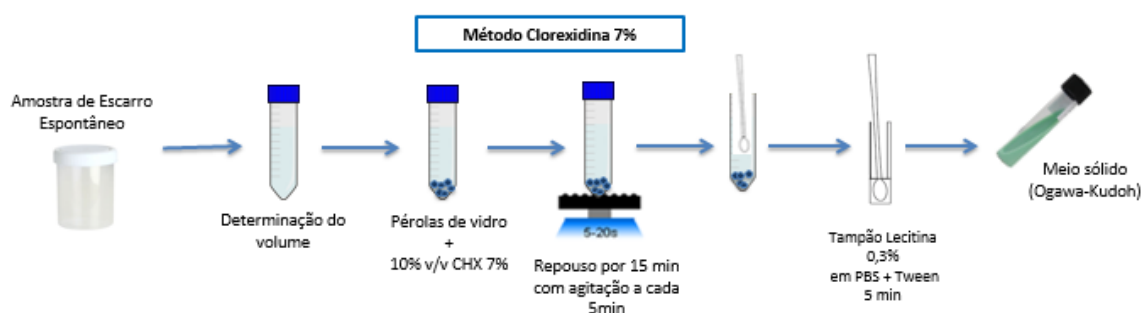


Figura 14. Avaliação da descontaminação e isolamento de micobactérias em amostras de escarro após digestão mecânica e exposição a CHX seguida de neutralização.

O teste de descontaminação após a fluidificação e neutralização das amostras (Tabela 3) demonstrou que a taxa de contaminação utilizando o método de referência (método OK - NaOH 4%) foi de 7,2% e com a solução de CHX 7% foi de 3,5%. Observamos também que a taxa de positividade utilizando o NaOH 4% (método OK) foi de 16,0% e a de CHX 7% (15min) foi de 19,7%.

Tabela 4. Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização da etapa de fluidificação e posterior descontaminação e neutralização das amostras utilizando CHX 7%.

SOLUÇÃO	N	NEG n (%)	POS n (%)	CC n (%)	FISHER p valor	OR
NaOH 4%	56	43 (76,8%)	9 (16,0%)	4 (7,2%)	-	-
CHX 7% (15min)	56	43 (76,8%)	11 (19,7%)	2 (3,5%)	0,6447	0,41

N = total de culturas; NEG = culturas negativas; POS = culturas positivas (culturas que apresentaram crescimento de bacilo álcool-ácido resistente); CC = culturas contaminadas; FISHER p valor e OR (Odds Ratio) = análise relacionada ao número de culturas POS e CC do grupo CHX 7% (15min) em relação ao NaOH 4%.

5.3.3 Descontaminação utilizando OMNIGene® em diferentes tempos

Nesse ensaio, foram selecionadas 101 amostras de pacientes com suspeita de TBP. Todas as amostras foram inicialmente processadas pelo método de OK para controle. Posteriormente, as amostras foram descontaminadas pelo método de descontaminação com OMNIGene® v/v durante 24 horas (Figura 15).

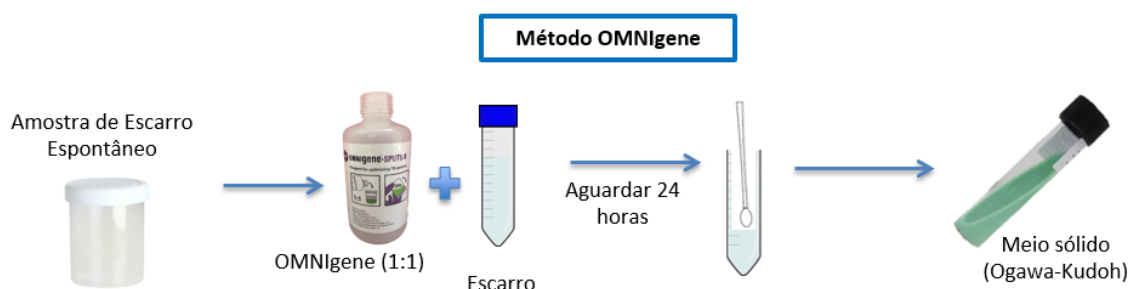


Figura 15. Avaliação da descontaminação e isolamento de micobactérias em amostras de escarro após exposição a OMNIgene® em 24 horas.

O teste de descontaminação com OMNIgene® após 24 horas demonstrou que a taxa de contaminação foi inferior ao método de referência (método OK - NaOH 4%), e a positividade foi superior (Tabela 5), apesar da diminuição da taxa de contaminação utilizando o OMNIgene® não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,2408$).

Tabela 5. Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização da etapa de descontaminação das amostras utilizando OMNIgene® em 24 horas.

SOLUÇÃO	N	NEG n (%)	POS n (%)	CC n (%)	FISHER p valor	OR
NaOH 4%	101	80 (79,2%)	15 (14,9%)	6 (5,9%)	-	-
OMNIgene® (24 horas)	101	82 (81,2%)	17 (16,8%)	2 (2,0%)	0,2408	0,29

N = total de culturas; NEG = culturas negativas; POS = culturas positivas (culturas que apresentaram crescimento de bacilo álcool-ácido resistente); CC = culturas contaminadas; FISHER p valor e OR (Odds Ratio) = análise relacionada ao número de culturas POS e CC do grupo OMNIgene® (24 horas) em relação ao NaOH 4%.

Posteriormente, foram selecionadas mais 25 amostras de pacientes com suspeita de TBP para avaliar outros tempos de descontaminação com OMNIgene®, visando obter melhores taxas de positividade. Para tal, todas as amostras foram inicialmente processadas pelo método de OK para controle e em seguida submetidas à descontaminação com OMNIgene® (v/v) em diferentes intervalos de tempo (1, 2 e 24 horas) (Figura 16).

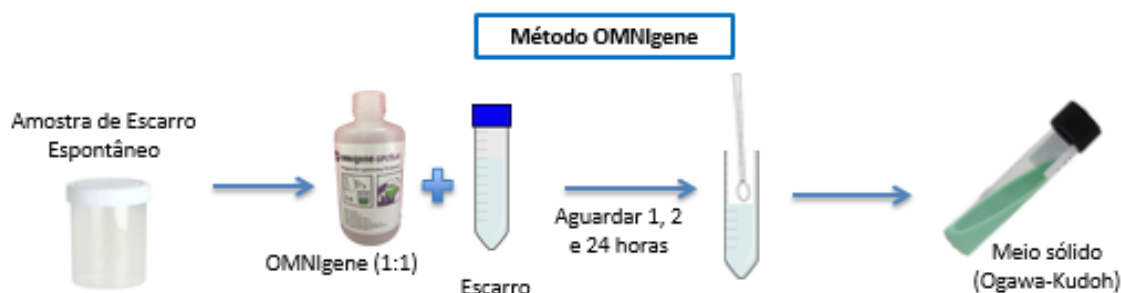


Figura 16. Avaliação da descontaminação e isolamento de micobactérias em amostras de escarro após exposição a OMNIgene® em diferentes intervalos de tempo.

Observamos nos experimentos que após exposição com o OMNIgene® em variados tempos (1, 2 e 24 horas) quanto maior o tempo de exposição (24 horas) mais liquefeita a amostra se apresentava (Figura 17).

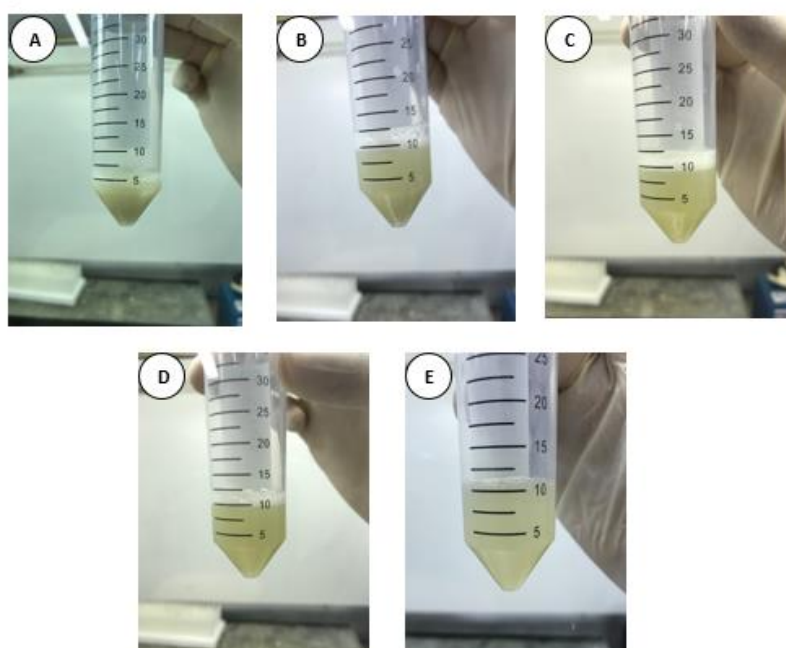


Figura 17. Liquefação das amostras após exposição com o OMNIgene®.

A) amostra antes de ser processada; B) amostra + OMNIgene® (v/v) logo após a adição do reagente; C) amostra + OMNIgene® (v/v) 1 hora após exposição; D) amostra + OMNIgene® (v/v) 2 horas após exposição; E) amostra + OMNIgene® (v/v) 24 horas após exposição.

Este teste não apresentou culturas contaminadas para o método padrão utilizando NaOH, nem para o OMNIGene® nos diferentes tempos (1, 2 e 24 horas). Observamos também que a taxa de positividade utilizando o OMNIGene® em exposição (1, 2 e 24 horas) foi equivalente a descontaminação utilizando o NaOH 4% (Tabela 6).

Tabela 6. Taxas de culturas negativas, positivas e contaminadas após realização da etapa de descontaminação das amostras utilizando OMNIGene® em diferentes intervalos de tempo.

SOLUÇÃO	N	NEG n (%)	POS n (%)	CC n (%)
NaOH 4%	25	15 (60,0)	10 (40,0)	0 (0,0%)
OMNIGene® (1 hora)	25	15 (60,0)	10 (40,0)	0 (0,0%)
OMNIGene® (2 horas)	25	15 (60,0)	10 (40,0)	0 (0,0%)
OMNIGene® (24 horas)	25	14 (56,0)	11 (40,0)	0 (0,0%)

N = total de culturas; NEG = culturas negativas; POS = culturas positivas (culturas que apresentaram crescimento de bacilo álcool-ácido resistente); CC = culturas contaminadas.

Discussão

6. DISCUSSÃO

De acordo com a OMS, aproximadamente 3,6 milhões de casos de TB ativa não são diagnosticadas no mundo anualmente, devido ao acesso limitado dos pacientes a testes de diagnóstico confirmatórios, como ensaios moleculares ou cultura de micobactérias.

Atualmente as técnicas moleculares reduzem o tempo de detecção e identificação de MTB. Entretanto, apesar desses métodos serem promissores no diagnóstico de TB, elas apresentam menor sensibilidade em amostras de pacientes paucibacilíferos, e ainda possuem custo elevado comparado com os métodos convencionais utilizados (LIMA et al., 2008).

Por sua vez, a cultura de micobactérias é considerada padrão-ouro para o diagnóstico da TB, pois permite o isolamento e a identificação do agente etiológico proporcionando valiosa contribuição para o diagnóstico da TB (PALOMINO et al., 2007; NATHAVITHARANA et al., 2019). Mas algumas limitações da técnica, como a contaminação da cultura por outros microrganismos, podem impedir o crescimento de micobactérias no meio de cultura e consequentemente interferir no resultado do exame. Esta situação pode gerar um desapontamento por parte da equipe médica e custos adicionais relacionados à coleta de amostra de escarro e realização de um novo exame.

Apesar das recomendações de diferentes métodos de descontaminação para amostras, ainda assim vários estudos evidenciam altas taxas de contaminação nas culturas de micobactérias de pacientes com TBP tanto para culturas líquidas quanto para sólidas (TORTOLI et al., 1999; KANCHANA et al., 2000; PERES, R. et al., 2011; COSTA et al., 2018), impedindo muitos laboratórios de alcançarem a taxa de contaminação ideal de 3% a 5% recomendada pela OPAS.

A descontaminação das amostras utilizando NaOH, recomendado pelo Ministério da Saúde, que frequentemente é usado nas rotinas laboratoriais, também não impede a ocorrência de contaminações. Peres e colaboradores (2009), verificaram que a descontaminação com NaOH 1% apresentou taxa de contaminação de 14% nas culturas, e que ao aumentar a concentração de NaOH para 1,25%, a taxa de contaminação reduziu para 10% ($p=0,001$), porém a taxa de positividade foi menor, demonstrando que o NaOH interfere na viabilidade das micobactérias (PERES et al.,

2009). Essa relação direta entre concentração e tempo de exposição do agente em relação a capacidade de isolamento (detecção) e a taxa de contaminação já é conhecida na literatura (KENT; KUBICA, 1985) e um grande desafio para desenvolvimento de novos métodos de digestão/descontaminação.

Portanto, conhecendo-se essa interferência do NaOH na viabilidade das micobactérias, pesquisadores vem buscando desenvolver métodos de digestão/descontaminação utilizando reagentes como a CHX (FERRONI et al., 2006; ASMAR; DRANCOURT, 2015) e o OMNIGene® (MAHARJAN et al., 2016; ASANDEM et al., 2018; AZAM et al., 2018) que são menos drásticos para as micobactérias, mas que conseguem conter o crescimento de contaminantes nos meios de cultura.

O OMNIGene® tem a função de preservar a viabilidade de micobactérias (AZAM et al., 2018; GENOTEK, 2018), mas a CHX, assim como o NaOH, também apresenta toxicidade para as micobactérias. Portanto, antes de processar as amostras dos pacientes, avaliamos a interferência da CHX no crescimento da cepa referência de MTB H37Ra ATCC 25177 para verificar se seria uma boa alternativa ao reagente do método padrão.

Os nossos resultados demonstraram que, em diferentes concentrações (0,2%, 0,5% e 0,7%), a CHX interferiu menos na viabilidade de MTB do que o NaOH, resultado este similar aos encontrados por Ferroni e colaboradores (2006) e Asmar (2015). Porém, estes estudos haviam comprovado essa menor toxicidade através de um método indireto com adição de CHX na amostra e envolvendo etapa de concentração por centrifugação, mas nós conseguimos também observar essa menor interferência na viabilidade de MTB após descontaminação através de um método direto com swab, imergindo a suspensão de MTB em CHX.

Com o intuito de desenvolver e avaliar novos métodos diretos de digestão/descontaminação de EE para cultura de micobactérias, o presente estudo utilizou amostras de EE de pacientes sintomáticos respiratórios que residiam no município de Cariacica (ES) e que foram processadas no laboratório de micobacteriologia do NDI.

Nesse contexto, iniciamos a segunda fase do estudo analisando as amostras processadas utilizando os descontaminantes NaOH, CHX e OMNIGene® por métodos diretos, que não incluem centrifugação. Dessa forma, observamos que utilizando a CHX em diferentes concentrações (0,5%, 0,7% e 0,9%) a taxa de contaminação nas

culturas foi estatisticamente superior ($p=0,0174$, $p=0,0074$, $p=0,0138$, respectivamente) ao método utilizando NaOH 4%.

Por outro lado, o descontaminante OMNIGene[®], foi equivalente ($p=1,0000$) ao método com NaOH 4% no isolamento de MTB e nas taxas de contaminação. Além disso, dos 43 pacientes analisados na comparação do NaOH com o OMNIGene[®], dois deles eram baciloscopia negativa e foram cultura negativa após processamento com NaOH, mas cultura positiva para MNT após processamento com OMNIGene[®] demonstrando a capacidade do novo descontaminante no isolamento de BAAR mesmo em amostras paucibacilares.

Apesar dos resultados satisfatórios com o OMNIGene[®], as taxas de contaminação com CHX foram muito superiores aos encontrados na literatura (FERRONI et al., 2006; ASMAR; DRANCOURT, 2015). Porém, acreditamos que essa diferença possa ter ocorrido porque o método direto de descontaminação que utilizamos não englobou uma etapa prévia de fluidificação do escarro contida no método indireto utilizado por Asmar (2015) e Ferroni (2006). Dessa forma, a CHX não deve ter sido capaz de penetrar o muco do escarro e agir sobre os contaminantes. Portanto, para solucionar essa dúvida, propusemos acrescentar uma etapa de fluidificação antes da descontaminação com CHX e OMNIGene[®] para tentar reduzir a taxa de contaminação.

Ao incluir a etapa de fluidificação do escarro, avaliamos também diferentes tempos de exposição à CHX 0,7% e ao OMNIGene[®]. Com os resultados, observou-se que a fluidificação do escarro promoveu uma diminuição na taxa de contaminação de 53,5% para 20,0% utilizando a CHX 0,7% por 2 minutos, porém ainda se manteve estatisticamente superior ($p=0,0002$) à taxa de contaminação com NaOH 4%. Problema este resolvido após aumento no tempo de exposição da CHX 0,7% para 15 minutos, não havendo diferença estatística ($p=0,6175$) comparado com o NaOH 4%, tempo semelhante ao utilizado por Asmar (2015) e Ferroni (2006).

Observou-se também que a taxa de contaminação após fluidificação da amostra e descontaminação do swab com OMNIGene[®] por 30 minutos manteve-se praticamente a mesma da taxa após utilizar OMNIGene[®] v/v por 30 minutos (12,5% e 13,9%, respectivamente). De acordo com o fabricante DNA Genotek Inc., recomenda-se a descontaminação com o OMNIGene[®] por no mínimo 30 minutos, porém, de acordo com os testes realizados, observou-se que a redução e o aumento do tempo

de exposição com o reagente (15 min e 45 min) não alterou de forma significativa a taxa de contaminação ($p=0,2378$, $p=0,6546$, respectivamente) comparados com método que utiliza NaOH 4%.

Paralelamente, avaliamos a taxa de positividade, que quando utilizado OMNIGene® após a etapa de fluidificação observou-se que não teve diferença estatística comparado com o método direto de descontaminação com NaOH 4%. Por outro lado, utilizando o descontaminante CHX após a etapa de fluidificação observou-se uma menor taxa de positividade, o que pode indicar uma redução na viabilidade das micobactérias.

Asmar (2015) enfatiza que a CHX é potencialmente tóxica para as micobactérias, portanto recomenda que deve ser inativada pela lecitina de ovo. Por isso, em seu estudo, realizou uma etapa de neutralização com lecitina antes de inocular a amostra descontaminada com CHX em um meio de cultura à base de ágar. Entretanto, não realizou essa neutralização antes de inocular em um outro meio de cultura à base de ovo de galinha, pois este meio de cultura já continha lecitina, que é uma substância extraída de ovos.

Como também utilizamos um meio à base de ovo de galinha, desconsiderou-se a necessidade dessa etapa de neutralização da CHX, acreditando-se que a lecitina do próprio meio de cultura seria suficiente para neutralizá-la. Porém, a redução na positividade indica que possa estar havendo ainda uma ação residual da CHX após inoculação. Por isso, a fim de garantir a viabilidade das micobactérias presentes na amostra, modificamos a metodologia para incluir uma nova etapa de neutralização, na busca de inativar a ação bactericida da CHX após o tempo de exposição.

Os resultados obtidos após realização da etapa de fluidificação e posterior descontaminação e neutralização das amostras utilizando CHX 7% (na proporção 1:10) demonstraram que a taxa de contaminação continuou equivalente ($p=0,6447$) ao método com NaOH 4% e também conseguimos resolver o problema da taxa de positividade, que foi equivalente ao método padrão.

Aqui, observamos que um método direto de descontaminação à base de CHX também é eficaz contra contaminantes e apropriado para a viabilidade de micobactérias, corroborando os achados de Asmar (2015) que encontrou resultados semelhantes com um método indireto utilizando CHX.

Tendo em vista os estudos utilizando o OMNIGene® como reagente de transporte de amostras e por ser um método de simples manuseio demonstrando uma alta potência para suprimir outros contaminantes, mantendo a viabilidade e melhor isolamento de MTB por até oito dias (ASANDEM et al., 2018; AZAM et al., 2018), optamos analisar também o emprego desse reagente deixando a amostra em exposição com OMNIGene® por um período de 24 horas.

Os resultados obtidos nesse experimento demonstram que após um dia em exposição da amostra com o reagente, a fluidificação do EE é muito mais eficaz e o índice de contaminação dos meios de cultura inoculados em relação ao método padrão com NaOH 4% manteve-se equivalente ($p=0,2408$), porém observou-se uma positividade tardia. Asandem (2018) também observou um atraso na positividade das culturas após descontaminação com OMNIGene® por 14 dias devido à demora na inoculação no meio de cultura.

Portanto, como a viabilidade das micobactérias foi mantida em nossos experimentos, acredita-se que esse aumento no tempo de positividade deva-se à inoculação no meio 24 horas após a inoculação com a técnica utilizando NaOH 4%. Por isso, propusemos avaliar o OMNIGene® diminuindo sua exposição para 1 e 2 horas para descontaminação do escarro.

Em relação ao tempo de exposição do descontaminante OMNIGene® que foi utilizado em diferentes tempos (1, 2 e 24 horas) observou-se que a taxa de contaminação foi equivalente para todos os tempos, comparado com o método padrão NaOH 4%. O OMNIGene® demonstrou alta eficácia para suprimir os contaminantes e alcançou resultados promissores na manutenção da viabilidade das micobactérias. Pelo fato do OMNIGene® apresentar uma maior positividade, ser de fácil manuseio, obter uma liquefação eficaz, pode ser considerado um método útil para o exame de cultura de micobactérias.

Os estudos disponíveis com OMNIGene® o avaliaram como reagente de transporte de amostras, mas nunca foi utilizado como reagente em métodos laboratoriais para descontaminação de amostras, sendo este estudo pioneiro nessa análise.

Com este estudo, foi possível desenvolver e avaliar dois novos métodos diretos de digestão/descontaminação de escarro para semeadura em meios de cultura sólido e isolamento de micobactérias utilizando CHX e OMNIGene®. Os novos métodos

modificados desenvolvidos são promissores e eventualmente poderão ser incorporados na rotina da realização de exames de cultura.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- 1) As concentrações de 0,2%, 0,5% e 0,7% de Clorexidina interferem menos na viabilidade de MTB do que o NaOH 4% (são menos drásticas);
- 2) A capacidade de descontaminação do OMNIGene® v/v por 30 minutos é equivalente ao método padrão com o NaOH 4%;
- 3) O procedimento de descontaminação de amostras escarro com CHX a 0,5%, 0,7% e 0,9% por 2 minutos não é eficaz para inibir o crescimento de organismos contaminantes no meio de cultura;
- 4) A fluidificação do escarro reduz a taxa de contaminação das culturas após descontaminação das amostras com CHX 0,7%, quando associado ao aumento do tempo de exposição à CHX para 15 minutos;
- 5) A capacidade de descontaminação com o OMNIGene® não é alterada pela fluidificação prévia da amostra, nem com aumento no tempo de exposição para 45 minutos;
- 6) A eficiência (baixa taxa de contaminação e alta taxa de positividade) do procedimento de descontaminação de amostras de escarro com CHX a 0,7% por 15 minutos com agitação e seguida de neutralização com Lecitina de ovo é comparável ao método padrão com o NaOH 4%;
- 7) Quanto maior o tempo de exposição ao OMNIGene® (até 24 horas), maior a liquefação da amostra, porém este processo não interfere nas taxas de positividade e de contaminação.

Referências

8. REFERÊNCIAS

AHMAD, S. Pathogenesis , Immunology , and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, p. 17, 2011.

ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHEL, A. L.; et al. Mycobacterium tuberculosis Complex Pathogen . , v. 16, n. 8, p. 1–4, 2010.

ASANDEM, D. A.; POKU, A. A.; ASARE, P.; et al. OMNIgene SPUTUM : A Good Transport and Decontaminating Reagent for Tuberculosis Testing. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 7, n. 3, p. 222–227, 2018.

ASMAR, S.; CHATELLIER, S.; MIRANDE, C.; et al. A chlorhexidine- agar plate culture medium protocol to complement standard broth culture of Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 2014–2017, 2016.

ASMAR, S.; DRANCOURT, M. Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing Mycobacterium tuberculosis. **BMC Microbiology**, p. 4–9, 2015. BMC Microbiology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0479-4>>.

AZAM, K.; CADIR, N.; MADEIRA, C.; GILLESPIE, S. H. OMNIgene . SPUTUM suppresses contaminants while maintaining Mycobacterium tuberculosis viability and obviates cold-chain transport. **European Respiratory Journal**, v. 4, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1183/23120541.00074-2017>>.

AZÉ, J.; SOLA, C.; ZHANG, J.; LAFOSSE-MARIN, F.; YASMIN, M. Genomics and Machine Learning for Taxonomy Consensus: The Mycobacterium tuberculosis Complex Paradigm. **PLoS ONE**, p. 1–24, 2015.

BARBERIS, I.; BRAGAZZI, N. L.; GALLUZZO, L.; MARTINI, M. The history of tuberculosis : from the first historical records to the isolation of Koch ' s bacillus. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 9–12, 2017.

BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. L. Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer. **Science**, v. 257, p. 1055–1064, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.257.5073.1055>>.

BOEHME, C.; NABETA, P. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. ... **England Journal of ...**, v. 363, n. 11, p. 1005–1015, 2010. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa0907847>>.

BRODIE, D.; SCHLUGER, N. W. The Diagnosis of Tuberculosis. , v. 26, p. 247–271, 2005.

CHEW, W. K.; LASAITIS, R. M.; SCHIO, F. A.; GILBERT, G. L. Clinical evaluation of the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with radiometric (Bactec) and solid media for isolation of Mycobacterium species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 821–827, 1998.

COLEBUNDERS, R.; BASTIAN, I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 2, p. 97–107, 2000.

COSTA, R. R.; SILVA, S. F. DA; FOCHAT, R. C.; et al. Comparison between Ogawa-Kudoh and modified Petroff techniques for mycobacteria cultivation in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. , v. 16, n. 2, p. 1–5, 2018.

CRUCIANI, M.; SCARPARO, C.; MALENA, M.; et al. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2321–2325, 2004.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, , n. 100, p. 1862–1870, 2006.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G.; et al. The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. , 2013.

FERRONI, A.; VU-THIEN, H.; LANOTTE, P.; et al. Value of the Chlorhexidine Decontamination Method for Recovery of Nontuberculous Mycobacteria from Sputum Samples of Patients with Cystic Fibrosis. , v. 44, n. 6, p. 2237–2239, 2006.

FURIN, J. J.; JOHNSON, J. L. Recent advances in the diagnosis and management of tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**, v. 11, n. 3, p. 189–194, 2005.

GENOTEK, D. **Protocolo de coleta e preparação de amostras de escarro para usar em testes de tuberculose usando o OMNIgene®•SPUTUM**. 2018.

GITTEH, E.; OTU, J. K.; JOBARTEH, T.; et al. Evaluation of sodium hydroxide-N-acetyl-L-cysteine and 0,7% chlorhexidine decontamination methods for recovering Mycobacterium tuberculosis from sputum samples: A comparative analysis (The Gambia Experience). **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, p. S167–S168, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.09.020>>.

GLOBAL LABORATORY INITIATIVE. **Mycobacteriology Laboratory Manual**. 2014.

GREENBAUM, M.; BEYT, B. E.; MURRAY, P. R. The Accuracy of Diagnosing Pulmonary Tuberculosis at a Teaching Hospital 1-3. , v. 121, p. 477–481, 1980.

GROSSMAN, E.; REITER, G.; STURZENBERGER, O. P.; et al. Six-month study of the effects of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults. **Journal of Periodontal Research Supplement**, , n. 1972, p. 33–43, 1986.

HOBBY, G. L.; HOLMAN, A. P.; ISEMAN, M. D.; JONES, J. M. Enumeration of Tubercle Bacilli in Sputum of Patients with Pulmonary Tuberculosis. , v. 4, n. 2, p. 94–104, 1973.

JAIN, P.; THALER, D. S.; MAIGA, M.; et al. Reporter phage and breath tests: Emerging phenotypic assays for diagnosing active tuberculosis, antibiotic resistance, and treatment efficacy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. SUPPL. 4, p. 1142–1150, 2011.

KANCHANA, M. V.; CHEKE, D.; NATYSHAK, I.; et al. Evaluation of the BACTEC(TM) MGIT(TM) 960 system for the recovery of mycobacteria. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 37, n. 1, p. 31–36, 2000.

KASSAZA, K.; ORIKIRIZA, P.; LLOSA, A.; et al. Lowenstein-Jensen selective medium for reducing contamination in Mycobacterium tuberculosis culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2671–2673, 2014.

KATO-MAEDA, M.; BIFANI, P. J.; KREISWIRTH, B. N.; SMALL, P. M. The nature and consequence of genetic variability within Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 5, p. 533–537, 2001.

KENT, P. T.; KUBICA, G. P. **Public Health Mycobacteriology A Guide For The Level III Laboratory**. Atlanta, 1985.

KK LAHIRI, L. C.; SK CHATTERJEE, M. G. A Simple Cold Staining Method for Acid Fast Bacilli. **Medical Journal Armed Forces India**, , n. 50, p. 256–258, 1994.

KNECHEL, N. A. Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis. **Critical Care Nurse**, v. 29, n. 2, p. 34–44, 2009.

KUBICA. Sputum Digestion and Decontamination with N-ACETYL-L-CYSTEINE-SODIUM HIDROXIDE for culture of mycobacteria. , p. 775–779, 1962.

KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 51, n. 1, p. 71–82, 1974.

KUMAR, V.; BALAJI, S.; GOMATHI, N. S.; et al. Phage cocktail to control the exponential growth of normal flora in processed sputum specimens grown overnight in liquid medium for rapid TB diagnosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 3, p. 536–542, 2007.

LAWN, S. D.; MWABA, P.; BATES, M.; et al. Advances in tuberculosis diagnostics: The Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 349–361, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70008-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70008-2)>.

LEE, J. Y. Diagnosis and Treatment of Extrapulmonary Tuberculosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 78, p. 47–55, 2015.

LIMA, S. S. S.; CLEMENTE, W. T.; PALACI, M.; et al. Conventional and molecular techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a comparative study. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. December 2007, p. 1056–1062, 2008.

MAHARJAN, B.; SHRESTHA, B.; WEIRICH, A.; STEWART, A.; KELLY-CIRINO, C. D. A novel sputum transport solution eliminates cold chain and supports routine tuberculosis testing in Nepal. **JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY AND GLOBAL HEALTH**, 2016. Ministry of Health, Saudi Arabia. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jegh.2016.04.002>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1ª ed. Brasília, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Brasil livre da tuberculose. Plano Nacional pelo fim da Tuberculose como problema de Saúde Pública**. 1st ed. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença**. 2019a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de Recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil**. 2019b.

NATHAVITHARANA, R. R.; YOON, C.; MACPHERSON, P.; et al. Guidance for Studies Evaluating the Accuracy of Tuberculosis Triage Tests. , v. 220, n. Suppl 3, 2019.

NORBIS, L.; MIOTTO, P.; ALAGNA, R.; CIRILLO, D. M. Tuberculosis: lights and shadows in the current diagnostic landscape. **New Microbiologica**, v. 36, p. 111–120, 2013.

PAI, M.; BEHR, M. A.; DOWDY, D.; et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16076, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201676>>.

PALACI, M.; PERES, R. L.; MAIA, R.; et al. Contribution of the Ogawa-Kudoh swab culture method to the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 17, n. 6, p. 782–786, 2013.

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

PALOMINO, J. C. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 12, n. 1070–5287; 3, p. 172–178, 2006.

PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007**. 2007.

PERES, R. L.; MACIEL, E. L.; MORAIS, C. G.; et al. Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. January, p. 1572–1575, 2009.

PERES, R. L.; PALACI, M.; LOUREIRO, R. B.; et al. Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes using increased PANTA concentration. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 15, n. 2, p. 281–283, 2011.

PERES, R.; PALACI, M.; LOUREIRO, R. B.; et al. Evaluation of oral antiseptic rinsing before sputum collection to reduce contamination of mycobacterial cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3058–3060, 2011.

PERKINS MD. **New diagnostics tools for tuberculosis**. Int J Tuberc Lung Dis. 2000, 4 (12 Suppl 2): 182-88.

PETROFF, S. A. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 21, p. 38–42, 1915.

RIBEIRO SN, GERHARDT FILHO G, LAPA E SILVA JR, SOUZA GRM, CORRÊA JC, MAGARÃO SL, GONTIJO FILHO PP, FONSECA LS, SANT'ANNA CC, HIJJAR MA, BETHLEM EP, BETHLEM N. **Tuberculose**. In: BETHLEM, N. Pneumologia. 4ªEd. São Paulo: Editora Atheneu, 1995. p. 379-448.

RODRIGUES, C.; VADWAI, V. Tuberculosis. Laboratory Diagnosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, n. 2, p. 111–127, 2012.

RYU, Y. J. Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis : Recent Advances and Diagnostic Algorithms. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 78, p. 64–71, 2015.

SAKULA, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Thorax**, v. 37, p. 246–251, 1982.

SCHIRM, J.; OOSTENDORP, L. A. B.; MULDER, J. G. Comparison of Amplicor , In-House PCR , and Conventional Culture for Detection of Mycobacterium tuberculosis in Clinical Samples. , v. 33, n. 12, p. 3221–3224, 1995.

SEONG, G. M.; LEE, J.; PH, D.; et al. Usefulness of Sputum Induction with Hypertonic Saline in a Real Clinical Practice for Bacteriological Yields of Active Pulmonary Tuberculosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 76, p. 163–168, 2014.

SHINNICK, T. M.; GOOD, R. C. Mycobacterial taxonomy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 884–901, 1994.

SWAI, H. F.; MUGUSI, F. M.; MBWAMBO, J. K. Sputum smear negative pulmonary tuberculosis : sensitivity and specificity of diagnostic algorithm. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 475, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/475>>.

TORTOLI, E.; CICHERO, P.; PIERSIMONI, C.; et al. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: Multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3578–3582, 1999.

WELLS, W. F.; RATCLIFFE, H. L.; CRUMB, C. On the of droplet nuclei infection. , 1948.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2016**. 2016.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2018**. 2018.

ZUMLA, A. The white plague returns to London - With a vengeance. **The Lancet**, v. 377, n. 9759, p. 10–11, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62176-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62176-9)>.

ZUMLA, A.; RAVIGLIONE, M.; HAFNER, R.; FORDHAM VON REYN, C. Tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 8, p. 745–755, 2013. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1200894>>.