



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

PEDRO SOUSA DE ALMEIDA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO SISTEMA
DE FILTRAÇÃO (BacFil 6.0) NA DETECÇÃO DE BACILOS ÁLCOOL-
ÁCIDOS RESISTENTES EM AMOSTRAS DE LAVADO
BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES COM SUSPEITA DE
TUBERCULOSE**

Vitória
2014

PEDRO SOUSA DE ALMEIDA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO
SISTEMA DE FILTRAÇÃO (BacFil 6.0) NA DETECÇÃO DE
BACILOS ÁLCOOL-ÁCIDOS RESISTENTES EM AMOSTRAS
DE LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES COM
SUSPEITA DE TUBERCULOSE**

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

Vitória
2014

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

A447d Almeida Júnior, Pedro Sousa de, 1986-
Desenvolvimento e avaliação da acurácia do sistema de filtração (BacFil 6.0) na detecção de bacilos álcool-ácido resistentes em amostras de lavado broncoalveolar de pacientes com suspeita de tuberculose./ Pedro Sousa de Almeida Júnior. – 2014.

96 f. : il.

Orientador: Moisés Palaci.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Filtração. 3. Diagnóstico.
4. Tuberculose pulmonar. 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 PEDRO SOUSA DE ALMEIDA JÚNIOR apresentou a dissertação intitulada “Desenvolvimento e avaliação da acurácia do sistema de filtração (BacFil 6.0) na detecção de bacilos álcool-ácidos resistentes em amostras de lavado broncoalveolar de pacientes com suspeita de tuberculose” 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, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar o farmacêutico PEDRO SOUSA DE ALMEIDA JÚNIOR a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 22 de julho de 2014

Prof. Dr. Afrânio Lineu Kritski
(Membro externo)

Profa. Dra. Silvana Spíndola de Miranda
(Membro externo)

Prof. Dr. Reynaldo Dietze
(Membro interno)

Prof. Dr. Moises Palaci
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tem sido o meu grande alicerce nas horas difíceis e para quem eu aprendi a recorrer não só para pedir ajuda, mas também para agradecer pelas manhãs acordadas e as conquistas realizadas.

À minha mãe, Dona Rutte, que sempre me apoiou em todas as situações da minha vida, sendo uma mãe compreensiva, presente, que nunca mediu esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos. Uma mãe sem igual, que nunca guardou mágoas e sempre priorizou o amor sobre todas as coisas. Sem ela eu não teria conseguido chegar onde eu cheguei e que, com certeza vai estar do meu lado me apoiando nos meus próximos passos, sejam eles quais forem.

À minha família, Lilian (minha irmã), Alfredo (meu padrasto) e Victor (meu sobrinho) e Aila (minha tia) pelo carinho e amor que sempre tiveram por mim mesmo nas horas mais difíceis e que sobretudo, aprenderam a conviver e respeitar minhas particularidades.

Ao Gustavo Campanha que foi meu grande companheiro nesses anos de mestrado, que sempre me ajudou e me motivou a continuar estudando e me qualificando para conseguir alcançar cada vez mais. Sem dúvida o melhor companheiro que uma pessoa pode querer, dedicou muito da sua vida para tentar fazer da minha vida especial, me proporcionou as melhores experiências que eu vivi nesses 28 anos. Não podia deixar de agradecê-lo por essa etapa concluída porque eu não teria conseguido sem ele.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moisés Palaci que me guiou nesse período e me deu oportunidade de desenvolver esse trabalho que deu origem a esta dissertação de mestrado.

À Solange Vinhas que foi a pessoa que me ensinou grande parte das técnicas que eu aprendi desde que entrei no Laboratório.

À Renata Lyrio que foi minha conselheira, minha psicóloga e minha companheira de “gordices” ao longo desse tempo. Nossas conversas e farras gastronômicas foram de grande importância para me desestressar.

À Tatiana C6 que teve toda a paciência do mundo comigo, sempre tentando me ajudar quando eu falhava e me dando todo o suporte que eu precisei para completar os experimentos desta dissertação.

À Laudicéia que me ajudou (e brigou comigo várias vezes) a deixar sempre meu material pronto e por comer comigo de 3 em 3 horas (risos).

Ao Luiz Guilherme que é um grande companheiro de laboratório, pessoa que eu sei que posso contar a todo instante, que nunca me deixou na mão e que sempre se mostrou disposto a ajudar. Um ser humano iluminado que veio pra esse plano disseminar sua luz e sua bondade. Não conheço pessoa mais altruísta do que ele, sem dúvida é uma pessoa que todos querem ter por perto pra sempre.

À Maria José que me deu grande apoio nos meus experimentos, inclusive quebrando a cabeça comigo em alguns (não publicados) que não deram muito certo!

Ao Dr. Valdério que nos ajudou em todo o trabalho nos fornecendo as amostras necessárias para o estudo.

A todos os meus colegas do Núcleo de Doenças Infecciosas que me aguentaram todos esses anos, porque eu sei que não sou uma pessoa fácil.

Aos meus amigos de Fortaleza que, mesmo apesar da distância, sempre me apoiaram e me incentivaram a continuar estudando e trabalhando.

“Forte é aquele que tira forças das suas próprias fraquezas.”

(Autor Desconhecido)

RESUMO

A baciloscopia é o principal método diagnóstico da tuberculose (TB) em razão do seu baixo custo, rapidez e facilidade de execução. Porém sua sensibilidade é baixa, principalmente nas formas paucibacilares da doença. Nesse sentido, novas metodologias que resultem no aumento da sensibilidade da baciloscopia tornam-se absolutamente necessárias. Neste estudo, nos propusemos a aprimorar e padronizar o sistema de filtração BacFil e avaliar sua performance e acurácia em amostras paucibacilares (lavado broncoalveolar). Para alcançar esses objetivos desenvolvemos o estudo em duas fases. Na primeira fase, foram realizados ensaios para definir: 1) utilização de membranas brancas para visualização de BAAR corados por Auramina-O; 2) aumento do volume de NALC, utilização de pérolas de vidro no processo de digestão das amostras e mudança no sistema do suporte do pré-filtro; 3) meios de fixação da membrana de filtração na lâmina de microscopia; 4) limite de detecção da técnica; 5) aumento do volume de NaOCl e a influência desse aumento na visualização de BAAR na membrana. Verificou-se que: a membrana de policarbonato branca tem a mesma eficiência da membrana de policarbonato preta na visualização de BAAR fluorescentes; o método modificado utilizando maior concentração de NALC, pérolas de vidro e sistema de pré-filtro baseado em orifícios obteve 98% de passagem das amostras pelo sistema; a melhor forma de fixação da membrana na lâmina foi obtida por intermédio da utilização de fita dupla face; o limite de detecção da técnica de filtração utilizando o sistema BacFil versão 6.0 foi de 2 a 9 BAAR por mililitro de suspensão bacteriana com D.O de $0,250 \pm 0,01$ a 625nm; o aumento da concentração de NaOCl para 10% ajuda na passagem de um maior volume de amostra pelo sistema, porém ocasiona a diminuição da quantidade BAAR na membrana de filtração após o período necessário para todo o processo. Na segunda fase foi avaliada a acurácia da técnica padronizada em 101 amostras de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com suspeita de TB provenientes do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes. Observou-se que a sensibilidade da técnica de filtração (BacFil versão 6.0) foi de 76% e especificidade de 95%. A sensibilidade obtida foi significativamente maior do que a observada na baciloscopia após centrifugação que foi de 59% ($p = 0,001$). No entanto, constatou-se uma diminuição de especificidade na técnica de filtração (95%) em relação a técnica de

centrifugação (99%). Concluímos que as modificações realizadas nos sistema de filtração permitiu sanar os problemas técnicos apresentados nas versões anteriores e aumentar a sensibilidade da baciloscopia de amostras paucibacilares (lavado broncoalveolar) para o diagnóstico da TB pulmonar.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, baciloscopia, filtração, diagnóstico, tuberculose pulmonar.

ABSTRACT

The smear microscopy is the main diagnostic method of tuberculosis (TB) due to its low cost, fastness and easy execution. However, its sensitivity is low especially in the paucibacillary forms of the disease. Therefore, new methods that enhance the sensitivity of smear microscopy are required. In this study, we proposed to improve and standardize the BacFil filtration system and to evaluate its performance and accuracy in bronchoalveolar lavage (BAL). To achieve these goals we developed a study in two stages. In the first stage we conducted assays to define: 1) use of polycarbonate white membranes to visualize fluorescent AFB stained by Auramine-O; 2) increase the volume of NALC, addition of glass beads in the digestion procedures and changes in the prefilter support; 3) ways to fixate the membrane on the microscopy slides; 4) the detection limit of the technique; 5) increased concentration of NaOCl and its influence to visualize AFB on the filtration's membrane. It was verified that: the polycarbonate white membrane has the same efficiency of the polycarbonate black membrane to visualize fluorescent AFB; the modified digestion method using higher volume of NALC and glass beads plus prefilter support system based on holes allowed 98% of the samples to pass through the filtration system; the best way to fixate the membrane on the slides was with double-side tape; the detection limit of the technique using the BacFil system version 6.0 was 2 to 9 AFB per milliliter of a bacterial suspension with O.D. = $0,250 \pm 0,01$; the use of NaOCl 10% (v/v) helps the passage of a higher volume of samples through the system, however it causes AFB loss on the filtration membrane after the time needed to finish all the process. In the second stage it was evaluated the accuracy of the standardized technique in 101 BAL of patients with suspected TB coming from Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes. We observed a higher sensitivity of filtration technique using the BacFil version 6.0 system (76%) when compared to the concentrated smear microscopy (59%), and this difference is statistically significant ($p = 0,001$). However, it was detected a lower specificity of the filtration technique (95%) in comparison with centrifuged smear microscopy (99%). We concluded that the modifications made on the filtration system allowed us to solve the technicals issues reported in previous versions, and to enhance the sensitivity of smear microscopy in paucibacillary samples (BAL) for the TB diagnosis.

Key-words: *Mycobacterium tuberculosis*, smear microscopy, filtration, diagnosis, pulmonar tuberculosis.

SIGLAS E ABREVIATURAS

¹⁸F-FDG	¹⁸ Fluorodeoxiglicose
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CMT	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
D.O.	Densidade óptica
HIV	do inglês " <i>Human Immunodeficiency Virus</i> "
LBA	Lavado broncoalveolar
LED	do inglês " <i>Light-Emitting Diode</i> "
MGIT	do inglês " <i>Mycobacterial Growth Indicates Tube</i> "
min	Minutos
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MVP	do inglês " <i>Mercury Vapor Lamp</i> "
NALC	N-acetil-L-cisteína
NaOCI	Hipoclorito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NDI/UFES	Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo
nm	nanômetro
O-K	Ogawa-Kudoh
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	do inglês " <i>Polymerase Chain Reaction</i> "
PhAS	Fenol Sulfato de Amônia
RFLP	do inglês " <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> "
STBP	do inglês " <i>Stop TB Partnership</i> "
TC	Tomografia computadorizada
TB	Tuberculose
TEP	Tomografia por emissão de prótons
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHA	do inglês " <i>World Health Assembly</i> "

μL microlitros
 $^{\circ}\text{C}$ grau Celsius

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Número estimado de casos de tuberculose em 2012.....	22
Figura 2: Critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen.....	27
Figura 3: Peças da parte superior do <i>holder</i> do sistema de filtração.....	48
Figura 4: Peças da parte inferior do <i>holder</i> do sistema de filtração e <i>holder</i> completo.....	49
Figura 5: Acoplamento do <i>holder</i> no tubo de centrífuga, acoplamento das duas partes de aço inox e sistema de filtração BacFil versão 6.0 completo.....	49
Figura 6: Acoplamento do <i>holder</i> no tubo de centrífuga, processo de retirada do membrana do <i>holder</i> e acomodação da mesma na lâmina de microscopia.....	50
Figura 7: Fixação da membrana de filtração em lâmina de microscopia para coloração.....	51
Figura 8: Esquema diluição seriada.....	53
Figura 9: Esquema do controle do inóculo em meio Middlebrook 7H11.....	54
Figura 10: Processamento de amostras de escarro utilizando 1mL e 2mL de amostras com diferentes concentrações de NaOCl (6% e 10%).....	55
Figura 11: Tempo de exposição das amostras de escarro ao NaOCl em diferentes concentrações (5% e 10%).....	56
Figura 12: Fluxograma de seleção de amostras de LBA para análise.....	57

Figura 13: Comparação da visualização de BAAR em membranas brancas e pretas coradas pelo método de Auramina-O.....61

Figura 14: Comparação da visualização de BAAR em membranas de filtração após diferentes tempos de exposição ao NaOCl nas concentrações de 5% e 10%.....65

Gráfico 1: Comparação da frequência de passagem de amostras de escarro pelo sistema BacFil Versão 6.0 utilizando amostras de escarro processadas pelo método proposto por Fennelly e colaboradores (2012) e pelo método modificado pelo grupo do NDI/UFES.....62

Gráfico 2: Frequência de passagem de amostras de escarro pelo sistema de filtração quando utilizadas duas concentrações diferentes de NaOCl (6% e 10%) no processamento de amostras de escarro.....64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Comparação entre diferentes métodos de processamento de amostras e baciloscopia direta.....63
- Tabela 2:** Limite de detecção de BAAR pela baciloscopia em membrana de filtração. Análise comparativa em modelo experimental com cultura quantitativa.....63
- Tabela 3:** Análise da baciloscopia semi-quantitativa das membranas de filtração de amostras de escarro com resultado de baciloscopia direta 3+.....66
- Tabela 4:** Análise da baciloscopia semi-quantitativa das membranas de filtração de amostras de escarro com resultado de baciloscopia direta 1+.....67
- Tabela 5:** Sensibilidade e especificidade do exame de baciloscopia em amostras de lavado bronco-alveolar após filtração pelo método BacFil versão 6.0.....68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1.Histórico.....	20
1.2.Epidemiologia.....	21
1.3.Agente Etiológico.....	22
1.4.Tuberculose.....	23
1.4.1.Quadro Clínico.....	23
1.4.2.Transmissão.....	23
1.4.3.Tratamento.....	24
1.4.4.Diagnóstico.....	24
1.4.4.1.Diagnóstico Clínico.....	24
1.4.4.2.Diagnóstico Radiológico.....	25
1.4.4.3.Diagnóstico Microbiológico.....	26
1.4.4.3.1.Microscopia.....	26
1.4.4.3.2.Cultura.....	27
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1.Diagnóstico da Tuberculose.....	30
2.1.1.Exames Microscópicos.....	30
2.1.1.1.Esfregaço Direto.....	30
2.1.1.2.Processamento e Digestão de Escarro.....	30
2.1.1.2.1.C ₁₈ -carboxipropilbetaína.....	30
2.1.1.2.2.N-acetil-L-cisteína / Hidróxido de sódio (NALC/NaOH).....	31
2.1.1.3.Sedimentação.....	31
2.1.1.3.1.Fenol Sulfato de Amônia (PhAS).....	31
2.1.1.3.2.Hipoclorito de Sódio (NaOCl).....	32
2.1.1.4.Concentração.....	32
2.1.1.4.1.Hipoclorito de Sódio.....	32
2.1.1.4.2.Citocentrifugação.....	33
2.1.1.4.3.Filtração.....	33
2.1.1.5.Colorações.....	35
2.2.Justificativa.....	37
3. OBJETIVOS.....	41

3.1. Objetivo Geral.....	42
3.2. Objetivos Específicos.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Estratégia do Estudo.....	44
4.1.1. Delineamento.....	44
4.1.2. Local.....	44
4.1.3. Desenho.....	44
4.1.4. Critérios de Inclusão.....	45
4.1.5. Fluxograma de Processamento de Amostras.....	45
4.2. Ensaio para Aprimoramento do Sistema de Filtração.....	46
4.2.1. Amostras.....	46
4.2.2. Comparação de visualização de bacilos em membranas brancas e pretas (MILLIPORE – ISOPORE™ MEMBRANE FILTERS).....	46
4.2.3. Aumento do volume de solução digestora (NALC / citrato de sódio) e adição de pérolas de vidro.....	46
4.3. Filtração.....	47
4.3.1. Montagem do sistema de filtração BacFil Versão 6.0.....	47
4.3.2. Descontaminação e fluidificação das amostras para realização da filtração.....	47
4.3.3. Filtração das amostras.....	48
4.3.4. Fixação das membranas de filtração em lâminas de microscopia.....	50
4.3.4.1. Utilização de pinça.....	50
4.3.4.2. Utilização de prendedores de corpo metálico e alças de aço inoxidável.....	51
4.3.4.3. Utilização de fita dupla face.....	51
4.3.5. Coloração e leitura das lâminas.....	52
4.3.6. Limite de detecção da técnica de filtração pelo sistema BacFil Versão 6.0.....	52
4.3.7. Aumento da concentração de NaOCl para melhoria na fluidificação das amostras de escarro (teste para aumento do volume de amostra).....	55
4.3.8. Análise da influência do uso de diferentes concentrações de NaOCl na visualização de BAAR na membrana de filtração.....	56

4.4.Avaliação do sistema de filtração BacFi® Versão 6.0 para amostras de lavado broncoalveolar (LBA).....	57
4.4.1.Amostras.....	57
4.4.2.Exame microscópico de lavado broncoalveolar (LBA).....	57
4.4.3.Cultura.....	58
4.4.3.1.Identificação dos bacilos.....	58
4.4.4.Filtração.....	59
4.5.Análises Estatísticas.....	59
4.6.Aspectos Éticos.....	59
5.RESULTADOS.....	60
5.1.Comparação da detecção de BAAR em diferentes membranas.....	61
5.2.Aumento do volume de solução digestora (NALC / citrato de sódio), adição de pérolas de vidro e mudança no suporte do pré-filtro para sistema de orifícios.....	62
5.3.Limite de detecção da baciloscopia em membranas de filtração – sistema BacFil versão 6.0.....	63
5.4.Aumento da concentração de NaOCl para melhoria na fluidificação das amostras de escarro.....	64
5.5.Análise da influência do uso de diferentes concentrações de NaOCl na visualização de BAAR na membrana de filtração.....	64
5.6.Sensibilidade e especificidade da técnica de filtração, sistema BacFil versão 6.0 para amostras de lavado broncoalveolar.....	67
6.DISSCUSSÃO.....	69
7.CONCLUSÕES.....	79
8.PERSPECTIVAS.....	81
9.REFERÊNCIAS.....	83

INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é o patógeno humano mais bem sucedido e um dos mais antigos da humanidade (KATO-MAEDA *et al.*, 2001). Um ancestral do MTB evoluiu com os hominídeos no leste da África há cerca de três milhões de anos (NAVIN *et al.*, 2002) e foram observadas lesões características de tuberculose (TB) em esqueletos de *Homo erectus* de 500.000 anos (KAPPELMAN *et al.*, 2008). Porém, os casos humanos mais antigos confirmados até o momento de TB são datados de 9.000 anos atrás, nos esqueletos de uma criança e de uma mulher encontrados em Altit, localizada ao sul de Haifa em Israel (HERSHKOVITZ *et al.*, 2008).

A TB foi conhecida por diversas denominações, como “phthisis” (adaptada à língua portuguesa como tísica), escrófula, *Lupus vulgaris* e Doença de Pott (BLOOM & MURRAY, 1992), e somente em 1679 Franciscus Sylvius iniciou o processo de unificação dos nomes descrevendo os nódulos pulmonares como “tubérculos”. Entretanto, somente em 1819, Schönlein batizou a doença como Tuberculose” (SAKULA, 1982; BLOOM & MURRAY, 1992).

Já no século 19, adquiriu o nome de “Peste Branca” em oposição à Peste Negra (Bubônica) e devido à perda da cor da pele. Na Europa, onde foi batizada com esse termo, a Peste Branca foi responsável por 25% de todas as mortes no continente, o que levou o rei da Espanha, Fernando VI, a ordenar que os médicos informassem às autoridades de saúde todos os casos de TB (HOLMBERG, 1990; ZUMLA, 2011). Somente em 1865, Jean-Antoine Villemin comprovou a natureza contagiosa da doença por meio da infecção de cobaias expostas a fluidos e pus de indivíduos doentes (SAKULA, 1982).

Após a descoberta que a TB era uma doença contagiosa, os olhares foram voltados para a identificação do microrganismo causador da doença. Em 1882, Robert Koch anunciou a descoberta do agente causador da TB, que foi originalmente denominado de *Bacterium tuberculosis* (KOCH, 1882). A criação do gênero

Mycobacterium por Lehmann e Neumann ocorreu somente 14 anos após a descoberta do agente etiológico da TB, este que finalmente passou a ser denominado como *Mycobacterium tuberculosis* (SHINNICK & GOOD, 1994).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Em 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou ter aproximadamente 8,6 milhões de casos de tuberculose no mundo, o equivalente a 122 casos por 100.000 habitantes. A maior parte dos casos estão na Ásia (58%) e África (27%), e uma menor proporção de casos na região do Mediterrâneo Oriental (8%), Europa (4%) e Américas (3%). Segundo esse órgão, os cinco países com maior número de casos são: Índia (2-2,4 milhões de casos), China (0,9-1,1 milhão de casos), África do Sul (0,4-0,6 milhão de casos), Indonésia (0,4-0,5 milhão de casos) e Paquistão (0,3-0,5 milhão de casos). O Brasil é considerado pela OMS como um dos 22 países de alta prevalência de TB, com taxa de incidência variando entre 38 e 55 novos casos por 100.000 habitantes (WHO, 2013) (Figura 1).

O Espírito Santo notificou, em 2011, 1.254 casos novos de TB com uma taxa de incidência de 35,4 casos por 100.000 habitantes. A capital, Vitória, apresentou uma taxa de incidência de 52,5 casos por 100.000 habitantes. Nos últimos dez anos esse indicador vem apresentando queda, semelhante à taxa de incidência no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

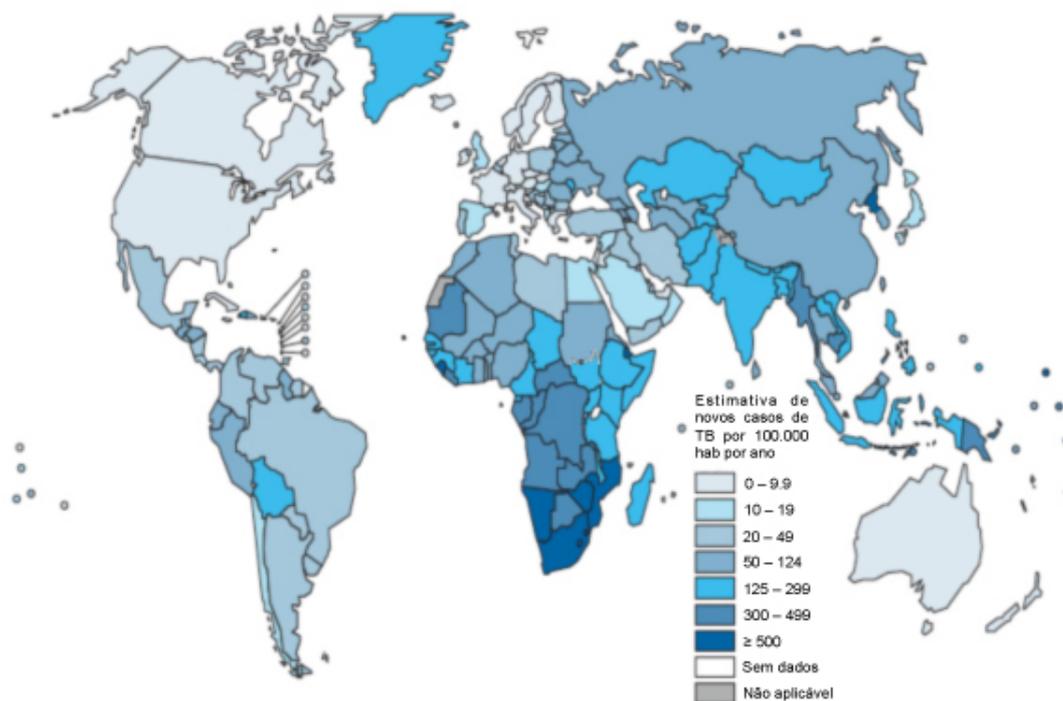


Figura 1. Número estimado de casos de tuberculose em 2012.
Fonte: Adaptado WHO, 2013

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O gênero *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacterineae*, ordem *Actinomycetales*, constituído de microrganismos pequenos em forma de bastão, medindo de 0,2 a 0,7 μm , imóveis, não-flagelados, não-esporulados e não-encapsulados. Possuem parede constituída principalmente de ácidos graxos (principalmente ácidos micólicos e ceras), o que confere a característica de resistência a álcalis, ácidos, antissépticos e um amplo espectro de antibióticos (KENT & KUBICA, 1986).

As micobactérias que causam a TB são geneticamente similares e são agrupadas em um complexo chamado Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em que estão incluídos: *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da TB em humanos; *M. africanum*, causador de TB em humanos 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 (WHO, 2012; DELOGU *et al.*, 2013) e, mais recentemente, *M. mungi* que foi

identificado em 2010 como causador de TB em mangustos na África (ALEXANDER *et al.*, 2010).

O MTB é um patógeno intracelular facultativo com tempo de geração de 14 a 18 horas em temperaturas próximas a 37°C. Por ser aeróbio estrito, tem predileção por sítios em que a tensão de oxigênio é maior no corpo humano, como o pulmões, o córtex renal, o córtex cerebral, as extremidades de crescimento dos ossos longos, as vértebras e glândulas adrenais (FIÚZA DE MELO *et al.*, 1996; KAUFMANN, 2001).

1.4 TUBERCULOSE

1.4.1 Quadro Clínico

Caracterizada como uma síndrome infecciosa, a TB acomete com maior frequência os pulmões. Nesta forma, os principais sinais e sintomas são: tosse por mais de três semanas, febre baixa e emagrecimento. O quadro clínico pode incluir ainda outras manifestações respiratórias como dispnéia, dor torácica e hemoptise. Na TB disseminada ou miliar, ocorre o comprometimento extensivo dos pulmões, fígado e medula óssea. Algumas condições debilitantes (desnutrição, idade avançada, estresse), a dependência química (drogas e alcoolismo) e doenças degenerativas e imunossupressoras são consideradas fatores que constituem riscos para o desenvolvimento da TB (FIÚZA DE MELO *et al.*, 1996).

1.4.2 Transmissão

A doença é transmitida quando um indivíduo com TB ativa espirra, tosse, fala ou canta, exalando gotículas contendo MTB. Essas gotículas, que medem de 1 a 5µm contendo de 2 a 3 bacilos viáveis (núcleo de Wells), podem permanecer em suspensão no ar até serem inaladas por uma pessoa susceptível (WELLS *et al.*, 1948). Dentro do período de duas a doze semanas, a resposta imunológica do novo hospedeiro pode prevenir a multiplicação e disseminação do MTB. Na grande maioria dos casos (mais de 90%), o patógeno é contido em um estado de infecção

assintomática latente, com risco de evolução para doença ativa de aproximadamente 5% nos primeiros 18 meses após infecção e 5% no restante da vida (ZUMLA *et al.*, 2013).

1.4.3 Tratamento

O tratamento da TB continua sendo um grande desafio a ser vencido. Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com o seu comitê técnico assessor, reviu o sistema de tratamento da TB no Brasil. Com base nos resultados preliminares do II Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos antiTB, que mostrou aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6,0%), O Ministério da Saúde introduziu o etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema básico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Essa recomendação é a preconizada pela OMS e utilizada na maioria dos países (WHO, 2010).

1.4.4 Diagnóstico

O diagnóstico tradicional da TB é realizado por intermédio da anamnese e exame físico do paciente (CHAN *et al.*, 2000), exame radiográfico, utilizando o raio-X do tórax onde são evidenciadas as lesões decorrentes do processo inflamatório/infeccioso da doença (GARAY, 2004) e exame microbiológico, em que se utilizam ferramentas de microscopia e cultura para a demonstração do agente etiológico no espécime clínico.

1.4.4.1 Diagnóstico Clínico

O primeiro passo para o diagnóstico correto da TB é a suspeita clínica. O paciente pode apresentar diversos sinais e sintomas inespecíficos. Desta forma, a TB deve ser considerada no diagnóstico diferencial de doenças com o mesmo aspecto clínico, principalmente em pacientes com risco epidemiológico (exposição à pacientes infectados, viagem ou residência em locais de alta prevalência e casos de TB prévia) (NORBIS *et al.*, 2013).

Alguns pacientes podem ser diagnosticados apenas com base na forte suspeita clínica e resposta ao tratamento anti-TB, mesmo na ausência de confirmação bacteriológica. Mesmo assim, recomenda-se que o diagnóstico clínico seja confirmado com exames complementares (CHAN *et al.*, 2000).

1.4.4.2 Diagnóstico Radiológico

Na grande maioria dos pacientes, a TB causa alterações radiográficas fortemente sugestivas da doença. Portanto, o exame radiográfico ainda é uma excelente ferramenta que auxilia no diagnóstico da TB (LANGE & MORI, 2010).

Tradicionalmente, acreditava-se que as manifestações clínicas e radiológicas em pacientes com infecção primária e reativação da TB eram distintas, porém estudos recentes baseados em genotipagem por RFLP (do inglês *restriction fragment length polymorphism*) demonstraram que as características radiográficas são semelhantes (GENG *et al.*, 2005) e que o grau de comprometimento do sistema imunológico prediz o aparecimento ou não dos padrões de tuberculose ativa nas imagens radiográficas. Desta forma, de uma maneira geral, indivíduos imunocomprometidos apresentam padrões de tuberculose primária e indivíduos imunocompetentes apresentam padrões de reativação da TB (JEONG & LEE, 2008).

O raio-X de tórax convencional ainda é a ferramenta mais comumente utilizada na triagem, diagnóstico e acompanhamento do tratamento em pacientes com TB pulmonar. No entanto, a tomografia computadorizada (TC) do tórax, particularmente a TC em alta resolução é um método mais sensível para identificação de lesões parenquimais e de alargamento do linfonodo mediastinal (JEONG & LEE, 2008; LANGE & MORIO, 2010).

Recentemente, a tomografia por emissão de pósitron (TEP) realizada com ¹⁸fluorodeoxiglicose (¹⁸F-FDG), capaz de detectar atividade de células inflamatórias de mamíferos, tem se mostrado uma técnica promissora no monitoramento da atividade da TB e resposta ao tratamento (WALLIS *et al.*, 2013). O único estudo

realizado em pacientes humanos demonstrou uma redução da captação de ^{18}F -FDG pelas células inflamatórias após um mês de tratamento em 19 dos 21 pacientes com TB. Dos dois pacientes que não foram responsivos ao TEP, um demonstrou tempo de conversão de cultura longo (positiva após 3 semanas) e o outro possuía diagnóstico de linfoma (MARTINEZ *et al.*, 2012).

1.4.4.3 Diagnóstico Microbiológico

1.4.4.3.1 Microscopia

O diagnóstico microbiológico da TB depende da detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em amostras biológicas por exames microscópicos ou por isolamento em culturas.

O exame microscópico de esfregaço de espécimes clínicos, ou baciloscopia, constitui o método diagnóstico mais empregado nos serviços de saúde, principalmente em países em desenvolvimento por sua simplicidade, rapidez e baixo custo. É capaz de detectar o mínimo de 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de espécime clínica e possui uma sensibilidade variável entre 20% e 80% (KENT & KUBICA, 1985 ; STEINGART, 2006 ; RODRIGUES & VADVAI, 2012).

O método mais utilizado para realização da baciloscopia é a coloração por Ziehl-Neelsen e Kinyoun, utilizando a carbol-fucsina como corante específico. Essas técnicas devem ser visualizadas em lente objetiva de imersão com a leitura de 100 campos microscópicos para que se possa liberar um resultado como negativo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O Ministério da Saúde (2008) recomenda a análise semi-quantitativa dos esfregaços de escarro. Os critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia estão descritos na Figura 2.

QUANDO:
• não são encontrados BAAR em 100 campos = relata-se o resultado como NEGATIVO;
• são encontrados de 1 a 9 BAAR em 100 campos = relata-se apenas a quantidade de BAAR encontrada;
• são encontrados de 10 a 99 BAAR, em 100 campos = relata-se o resultado como POSITIVO +;
• é encontrada em média de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados = relata-se o resultado como POSITIVO ++;
• é encontrada em média mais de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos observados = relata-se o resultado como POSITIVO +++.

Figura 2. Critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen.

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

1.4.4.3.2 Cultura

A cultura é a metodologia padrão-ouro para diagnóstico da TB por ser uma técnica de ótima sensibilidade, capaz de detectar o mínimo de 10 a 100 bacilos viáveis por mililitro de espécime clínico (PALOMINO, 2005).

Desde 1990, vários sistemas de detecção foram desenvolvidos, como cultura em meios sólidos ou em meios líquidos, com o intuito de melhorar a sensibilidade, isolamento e identificação do MTB em espécimes clínicos. Os meios de cultura sólidos mais utilizados são: Lowestein-Jensen e Ogawa (a base de ovo) e Middlebrook 7H10 e 7H11 (a base de ágar). Os meios de cultura em meio líquidos mais utilizados são: Middlebrook 7H9 e MGIT (CHEW *et al.*, 1998 ; FURIN & JOHNSON, 2005).

Estudos de revisão sistemática demonstraram que os meios de cultura líquidos são mais rápidos e sensíveis para detecção do MTB em espécimes clínicos do que os meios de cultura sólidos. Segundo Cruciani e colaboradores (2004), o tempo médio de detecção do sistema BACTEC MGIT960 é de 12,9 dias e 15 dias para o sistema BACTEC 460, o que é muito menor do que o tempo médio de crescimento em meio Lowestein-Jensen, que é de 27 dias. O mesmo estudo demonstrou que o BACTEC MGIT 960 é mais sensível (88%) quando comparado ao meio de cultura sólido

(76%), além de reduzir o tempo de obtenção de resultados de ensaios de sensibilidade à drogas de 42 para 28 dias (WHO, 2007).

Entretanto, a utilização de meios de cultura líquidos tem suas limitações: (1) maior propensão à contaminação por outros microrganismos ou outras micobactérias (que não tem importância clínica); (2) contaminação cruzada entre amostras durante o processamento e inoculação. Por esses motivos, a implantação das instalações do laboratório onde são realizadas as culturas deve dar ênfase a equipamentos de biossegurança, treinamento, supervisão e controle de qualidade externo para seu funcionamento correto (RODRIGUES & VADWAI, 2012).

Revisão de literatura

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

2.1.1 Exames microscópicos

2.1.1.1 *Esfregação direto*

O exame de esfregação de amostra biológica para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) ainda constitui um dos principais recursos para diagnóstico da TB. É um método simples, rápido, barato e que pode ser realizado diretamente do material sem precisar de laboratórios altamente equipados (RODRIGUES & VADWAI, 2012).

A sensibilidade da técnica é variável, podendo chegar em até 80% (STEINGART *et al.*, 2006), porém essa sensibilidade pode ser menor, variando de 20% a 60%, principalmente em locais de alta prevalência da co-infecção TB/HIV (ELLIOTT *et al.*, 1993).

2.1.1.2 *Processamento e digestão de escarro*

2.1.1.2.1 C₁₈-carboxipropilbetaína

A utilização do C₁₈-carboxipropilbetaína, que é um detergente aniônico, foi proposta em 1998 com o objetivo de diminuir a tensão superficial e desfazer o fator corda. A técnica tinha também a intenção de evitar perda de bacilos no processamento e não interferir nas metodologias tradicionais de diagnóstico (tanto microscopia quanto cultura) (THORNTON *et al.*, 1998).

Apesar de ter demonstrado um aumento na sensibilidade de aproximadamente 6%, foi verificado também uma diminuição na especificidade (aproximadamente 9%) com taxa de contaminação quase 3 vezes maior quando comparada com o processamento com NALC/NaOH (THORNTON *et al.*, 1998).

2.1.1.2.2 N-acetil-L-cisteína / Hidróxido de sódio (NALC/NaOH)

O tratamento de escarro com agentes mucolíticos é amplamente utilizado. Esses agentes liquefazem as amostras, permitindo assim uma melhor visualização de BAAR em esfregaços. Dentre eles, o mais utilizado é a solução contendo N-acetil-L-cisteína (NALC) e hidróxido de sódio (NaOH) (UDDIN *et al.*, 2013).

Segundo Kent & Kubica (1985), o NALC é um forte agente mucolítico e os esfregaços feitos após o tratamento das amostras com o mesmo possuem menos *debris* e uma maior concentração de bacilos.

Essa metodologia pode aumentar a sensibilidade da baciloscopia substancialmente (APERS *et al.*, 2003), porém requer um maior nível de preparo do pessoal de laboratório, aumentando o tempo necessário para o diagnóstico, além de requerer um nível maior de biossegurança. Por essas razões, ainda não é amplamente utilizada nos países em desenvolvimento (UDDIN *et al.*, 2013).

Cattamanchi e colaboradores (2009) analisaram pacientes HIV positivos com doença respiratória suspeitos de TB e não verificaram diferença na sensibilidade da técnica de concentração com uso de NALC/NaOH em relação a baciloscopia direta. Em contrapartida, Uddin e colaboradores (2013), também analisando amostras de pacientes com doença respiratória suspeitos de TB, demonstraram um aumento de 12% na sensibilidade da microscopia realizada pelo método de NALC/NaOH quando comparada com a baciloscopia direta, sem perda na especificidade que, no estudo, foi de 100%.

2.1.1.3 Sedimentação

2.1.1.2.1 Fenol Sulfato de Amônia (PhAS)

A utilização do PhAS foi proposta como uma metodologia que visava principalmente a segurança dos técnicos que manipulam amostras biológicas potencialmente

infectantes, pois a utilização desse reagente esteriliza o material biológico (SELVAKUMAR *et al.*, 2002).

Apesar de ter se mostrado uma técnica de menor risco do ponto de vista da biossegurança, pois o PhAS tem ótimo poder esterilizante, a técnica demonstrou sensibilidade e especificidade comparável a baciloscopia direta com o inconveniente de apresentar uma etapa de sedimentação *overnight*, atrasando a liberação do resultado da baciloscopia em 1 dia (SELVAKUMAR *et al.*, 2002).

2.1.1.2.2 Hipoclorito de Sódio (NaOCl)

O NaOCl é o agente químico ideal para uso em países em desenvolvimento por ser altamente disponível e ter baixo custo. Suas vantagens no aumento da sensibilidade da microscopia estão relacionadas com a digestão do muco e *debris*, o que faz com que a lâmina se torne mais limpa, sendo mais fácil a visualização de BAAR (BONNET *et al.*, 2008 ; CATTAMANCHI *et al.*, 2010).

Cattamanchi e colaboradores (2010) realizaram uma revisão sistemática e metanálise sobre testes diagnósticos para TB. Os autores relataram dados variáveis em relação a sensibilidade da técnica de sedimentação com NaOCl, variando de 52% a 83%. Foi observada também uma diminuição na especificidade quando comparada com a baciloscopia direta. Por esses motivos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) não recomenda essa metodologia para laboratórios de rotina (WHO, 2010).

2.1.1.4 Concentração

2.1.1.3.1 Hipoclorito de sódio (NaOCl)

A técnica de digestão de escarro com NaOCl pode ser utilizada também para concentração de amostra por centrifugação. No mesmo estudo relatado no item 2.1.1.2.2, Cattamanchi e colaboradores (2010) mostraram que a sensibilidade da técnica de centrifugação com NaOCl se mostrou variável dentre os artigos

revisados, ficando entre 44% e 73%. Mesmo assim, a sensibilidade agrupada da técnica foi maior em comparação com a baciloscopia direta (65% *versus* 56%), porém houve uma diminuição da especificidade.

2.1.1.3.1 Citocentrifugação

O uso da citocentrífuga para concentração de amostras clínicas foi proposto por Saceanu e colaboradores em 1993 para aumentar a sensibilidade da microscopia. Neste estudo, utilizando amostras de escarro de pacientes com diagnóstico de doença outra que não TB, os autores relataram um aumento significativo na sensibilidade utilizando a citocentrífuga quando comparado com a baciloscopia direta (SACEANU *et al.*, 1993). Entretanto, Woods e colaboradores (1995), utilizando fluorescência para analisar esfregaços após citocentrifugação, não demonstraram diferença na detecção de BAAR. Dessa forma, os autores não recomendam o uso da citocentrífuga para processamento de amostras em laboratórios de rotina, principalmente pelo alto custo do equipamento e dos seus suprimentos (WOODS *et al.*, 1995).

2.1.1.3.2 Filtração

Smithwick & Stratigos, em 1981, postularam uma hipótese de que a sensibilidade da microscopia poderia se aproximar do exame de cultura se as amostras fossem concentradas. Dessa forma, desenvolveram um método de concentração de escarro em membrana de policarbonato. A técnica consistia na digestão do espécime clínico com NaOCl, seguido da adição de etanol 95% e posterior passagem da mistura por uma membrana de policarbonato de 25mm de diâmetro com poros de 1,0µm sob pressão negativa.

Em 2003, Birnbaum & Fennelly propuseram que a diminuição da área de filtração poderia levar a uma maior concentração de BAAR por campo microscópico. Para isso utilizaram suportes de inox de 13mm limitando a área de filtração através da compressão da membrana de policarbonato entre dois discos de Teflon® de 5mm de diâmetro, verificando nesse modelo os melhores resultados do experimento. Além

disso, propuseram a redução do tamanho dos poros da membrana de 1,0 μ m para 0,4 μ m para melhorar ainda mais a retenção de BAAR pelo sistema (BIRNBAUM & FENNELLY, 2003). Utilizando suspensões de *M. Smegmatis* (10⁵ CFU/mL) e diferentes diâmetros de membrana, Birnbaum & Fennelly (2003) realizaram um experimento para comprovar a maior retenção de BAAR na membrana com menor poro. Nos quatro experimentos independentes, constataram um aumento de 4,5 vezes na quantidade de BAAR visualizados na membrana de 13mm em comparação com a membrana de 25mm.

Modificações no sistema foram sugeridas por Fennelly e colaboradores (2012) e o sistema BacFil (versão 1.0) foi implementado utilizando membrana de policarbonato com poros de 0,8 μ m, limitando a área de filtração com anéis de Teflon[®] e utilização de suporte de aço inox. Além das modificações no sistema, os autores propuseram a utilização de soluções que ajudam na digestão e liquefação do escarro como NaLC/NaOH, NaOCl, álcool etílico e Triton X-100. Os autores utilizaram membranas pretas para coloração por Auramina-O, brancas para Ziehl-Neelsen e a pressão escolhida foi a de 20mmHg (FENNELLY *et al.*, 2012).

Os autores relataram uma sensibilidade de 89% para a técnica de filtração, maior do que a sensibilidade da técnica baciloscopia direta (56,1%) e após centrifugação (60,2%) para amostras com resultados concordantes (baciloscopia e cultura positivas). Nas amostras com resultados discordantes (baciloscopia negativa e cultura positiva), a sensibilidade da técnica de filtração foi de 73%. Segundo os autores, a sensibilidade relatada por eles está próxima a relatada por Boheme e colaboradores (2010) em relação à técnica XPert MTB/RIF (FENNELLY *et al.*, 2012).

No anos seguinte, duas versões intermediárias foram testadas (2.0 e 3.0) até a padronização de uma nova versão (4.0), avaliada por Quincó e colaboradores (2013), que possuía todas as peças de aço inox, utilizava pré-filtro de nylon de 30 μ m, suporte para pré-filtro com sistema de canaletas (Millipore[®]), pressão de 5 mmHg e bomba de vácuo de fluxo contínuo. Os autores relataram uma sensibilidade de 70,6% para o método de filtração, maior do que as sensibilidades observadas no método de centrifugação com e sem a utilização de NALC/NaOH (54,6% e 50,6%

respectivamente), sendo a metodologia que obteve maior sensibilidade tanto em pacientes HIV negativos quanto em pacientes HIV positivos (81,8% e 61,4% respectivamente) (QUINCÓ *et al.*, 2013).

Ao continuar o processo de aprimoramento do sistema BacFil de filtração, foi desenvolvida a versão 5.0, para a qual foram propostas modificações no processo de digestão das amostras e utilização de um sistema de suporte de pré-filtro de fabricação própria (com orifícios de 1mm de diâmetro cada). Entretanto, apesar das melhorias realizadas no sistema, Jones-López e colaboradores (2014), ao desenvolver um estudo em Kampala (Uganda), relataram que a sensibilidade da versão 5.0 para amostras de escarro era inferior a sensibilidade encontrada na baciloscopia direta e após centrifugação (48,5%, 60,9% e 63,3%, respectivamente).

2.1.1.5 Colorações

Os métodos tradicionais de coloração dos esfregaços são os que utilizam a fucsina como corante principal, como o Ziehl-Neelsen e Kinyoun. São técnicas rápidas, baratas e as mais utilizadas em laboratórios de países em desenvolvimento (RODRIGUES & VADWAI, 2012).

O aquecimento das lâminas é o grande inconveniente da técnica de Ziehl-Neelsen, pois os gases de carbol-fucsina gerados são prejudiciais. Pensando nisso, Vasanthakumari e colaboradores (1986) desenvolveram uma técnica de coloração a frio utilizando os mesmos reagentes utilizados para realização da coloração de Ziehl-Neelsen, porém com aumento do tempo de coloração. Os autores não observaram diferença estatística entre a coloração convencional de Ziehl-Neelsen e a modificada a frio.

A técnica a frio mais utilizada atualmente foi idealizada por Kinyoun (1914). A técnica utiliza uma concentração maior de carbol-fucsina e não produz gases prejudiciais à saúde (KINYOUN, 1914 ; CUI *et al.*, 2004). O autor relatou um aumento de 19% na sensibilidade da técnica de coloração a frio quando comparada com a técnica de Ziehl-Neelsen. Outras colorações a frio foram testadas, a maioria delas utilizando a

fenol na solução contendo fucsina básica, porém, não foi demonstrado aumento na sensibilidade da técnica quando comparada com a coloração de Ziehl-Neelsen (RAO *et al.*, 1966 ; PATHAN & ARAIN, 1988 ; SELVAKUMAR *et al.*, 2002).

Uma nova forma de leitura das baciloscopias coradas por Ziehl-Neelsen foi proposta por Shapiro & Hänscheid (2008). Os autores utilizaram microscópio de fluorescência, excitação por luz verde (546nm) e observaram emissão de cor vermelho alaranjada pela fucsina que foi detectada por filtro de 590nm. Neste estudo, os autores hipotetizaram que poderia haver aumento na sensibilidade da técnica de Ziehl-Neelsen, pois eles visualizaram estruturas com características morfológicas de BAAR, porém não confirmaram o achado (SHAPIRO & HÄNSCHEID, 2008).

O uso da técnica de coloração por fluorescência, que utiliza fluorocromos (auramina-O ou auramina-rodamina) para detecção de BAAR, foi proposto por Hagemann na década de 30 como uma técnica de coloração alternativa para aumentar a sensibilidade da microscopia, que tradicionalmente utiliza corantes compostos por carbol-fucsina (STEINGART *et al.*, 2006).

Os esfregaços corados por compostos fluorescentes oferecem vantagens sobre os corantes convencionais com fucsina (Ziehl-Neelsen e Kynioun) pois são mais fáceis de serem analisados. Sua visualização é realizada em aumento de 250X a 450X, o que possibilita a leitura de um maior número de campos em menos tempo (HUEBNER *et al.* 1993).

De acordo com os guias técnicos de microscopia de escarro da União Internacional contra Tuberculose e Doenças Pulmonares, o tempo mínimo requerido para liberação de uma lâmina negativa para TB, corada com corantes a base de fucsina, é de 5 minutos porém, na prática o tempo médio gasto na leitura é de 2 minutos (CAMBANIS *et al.*, 2007). Um estudo reportou que é possível obter maior sensibilidade e especificidade semelhante quando o tempo médio de 1 minuto é gasto na leitura de uma lâmina corada por fluorescência em comparação os esfregaços corados por Ziehl-Neelsen (nas quais são gastos 4 minutos) (BENNEDSEN & LARSEN, 1966).

Segundo Marais e colaboradores (2008), a microscopia convencional utilizando microscópios de luz ainda é o método mais utilizado nos países em desenvolvimento, mesmo com o advento da fluorescência. As principais razões são o tempo de vida baixo (200 a 300 horas) e o alto custo da lâmpada de mercúrio de arco curto (do inglês *mercury vapor lamp* - MVP) que é tradicionalmente utilizada como fonte de excitação de luz nos microscópios de fluorescência. Porém, os mesmos autores relatam que o microscópio que utiliza MVP pode ser custo-efetivo em países em desenvolvimento devido a economia que gera no trabalho, e pelo aumento substancial na sensibilidade da técnica de microscopia em locais com alta prevalência de pacientes HIV positivos (MARAIS *et al.*, 2008).

Para contornar os problemas inerentes a utilização da MVP, recentemente passou-se a utilizar lâmpadas de LED (*light-emitting diode*) que fornece uma fonte de luz barata com vida útil de 150.000 horas. Além disso, as lâmpadas de LED não representam risco potencial de toxicidade (MARAIS *et al.*, 2008).

Marais e colaboradores (2008) conduziram um estudo transversal com o intuito de comparar sensibilidade e especificidade das colorações convencionais (Ziehl-Neelsen) e fluorescência utilizando microscópios que utilizam MVP e LED. Nesse estudo não foi demonstrado diferença significativa em relação a sensibilidade da fluorescência analisada por microscópio com MVP e LED. O mesmo resultado foi encontrado por Alfred e colaboradores (2014) que além disso, relataram uma diminuição na especificidade da técnica de coloração por fluorescência com leitura por microscópio de LED quando comparada com a coloração por Ziehl-Neelsen (ALFRED *et al.*, 2014).

Recentemente, a OMS (2013) recomendou a substituição do microscópio convencional de fluorescência pelo microscópio de LED após ser evidenciado que a utilização deste não comprometia as vantagens operacionais da técnica tradicional de fluorescência (WHO, 2013). Porém, segundo Hänscheid e colaboradores (2008), o grande inconveniente da microscopia por LED é a falta de interesse por parte das indústrias em produzir microscópios com tal tecnologia, por isso os únicos

disponíveis no mercado ainda são monoculares, o que pode levar a fadiga ocular rapidamente.

2.2 JUSTIFICATIVA

O Novo Plano Global de Combate a TB, lançado pela *World Health Assembly* (WHA) e pelo *Stop TB Partnership* (STBP), defende a necessidade de ampliação de financiamento para controle da doença. Isto concerne o fortalecimento dos laboratórios que fazem diagnóstico e o auxílio à pesquisa para o desenvolvimento de novos testes que sejam rápidos, altamente sensíveis e específicos e que tenham uma boa relação custo-benefício (WHO, 2013).

Nesse sentido, novas metodologias que resultem no aumento da sensibilidade da microscopia poderiam ir ao encontro dos objetivos traçados pela OMS, tendo em vista que a baciloscopia é o exame tradicionalmente utilizado para diagnóstico de TB. Dentre os métodos propostos para tal objetivo, a filtração é uma técnica promissora, principalmente porque dispensa o uso da centrífuga.

Essa técnica foi desenvolvida em 1981 por Smithwick & Stratigos e tinha como objetivo principal concentrar amostras de escarro para melhorar a sensibilidade da baciloscopia. Utilizando uma membrana de policarbonato com área reduzida, os autores reportaram uma sensibilidade de 80,2%, maior do que a encontrada pelo método direto que foi de 55,8% (SMITHWICK & STRATIGOS, 1981). Entretanto, somente 20 anos após seu desenvolvimento foi que os pesquisadores Birnbaum & Fennelly (2003) retomaram o interesse pela técnica.

Em 2003, utilizando suspensões de *M. Smegmatis*, Birnbaum & Fennelly testaram membranas de 25mm e 13mm, estas com e sem suporte de Teflon®. Os autores verificaram que a metodologia tinha excelente poder de concentração de bacilos e propuseram que se essa metodologia fosse aplicada em amostras de escarro, poderia aumentar a sensibilidade da baciloscopia para o diagnóstico da TB pulmonar.

Nos anos seguintes, Fennelly e colaboradores avaliaram a hipótese proposta em 2003, realizando os teste de concentração de amostras de escarro em membranas de policarbonato de 13mm. Em 2012, os autores publicaram os resultados e, mesmo utilizando um método rudimentar, obtiveram uma sensibilidade de 89%, maior do que a observada após centrifugação da amostra que foi de 60,2% (FENNELLY *et al.*, 2012).

Devido aos problemas técnicos observados na versão 3.0 utilizada por Fennelly e colaboradores (2012) como: inconsistência da pressão exercida pela bomba de vácuo, desgaste e deformação dos anéis de vedação, quebra de válvulas de encaixe rápido e deformidades nas roscas dos *holders* de inox, uma nova versão do sistema foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa liderado pelos Professores Moisés Palaci e Reynaldo Dietze do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI/UFES).

A versão 4.0 do sistema, padronizada com volumes de soluções e amostra fixas, utilização de bomba de vácuo com pressão contínua e pressão 5mmHg, foi testada por Quincó e colaboradores que observaram uma sensibilidade de 81,8% em amostras de pacientes HIV negativos e 61,4% em amostras de pacientes HIV positivos (QUINCÓ *et al.*, 2013).

Embora satisfatórios, o resultado de sensibilidade obtido por Quincó e colaboradores (2013) foi inferior àqueles obtidos por Fennelly e colaboradores (2012). Além disso, Quincó e colaboradores (2013) verificaram que 10% das amostras de escarro não passaram pelo sistema de filtração.

Para suplantar os problemas observados nas versões anteriores do sistema BacFil, uma nova versão (5.0) do sistema de filtração foi testada em Uganda por Jones-López e colaboradores (2014). Entretanto, a sensibilidade da técnica utilizando esse novo sistema em amostras de escarro (48,5%), foi inferior às encontradas nas versões anteriores. Dessa forma, com o intuito de corroborar os dados apresentados anteriormente por Fennelly e colaboradores (2012) e Quincó e colaboradores (2013), que indicam um aumento importante na sensibilidade da técnica de filtração em

relação às técnicas tradicionais de baciloscopia, foi idealizada neste estudo a utilização do sistema BacFil em amostras paucibacilares (lavado broncoalveolar).

Aumentar a sensibilidade da baciloscopia de amostras paucibacilares é importante, principalmente em amostras de pacientes com resultado de baciloscopia negativa, e aqueles que não produzem escarro, como crianças e pacientes imunocomprometidos (OKUTAN *et al.*, 2003). Estes pacientes podem infectar de 3 a 5 indivíduos saudáveis antes de serem diagnosticados com TB (GRANJE *et al.*, 1989 *apud* OKUTAN *et al.*, 2003), além de iniciarem o tratamento tardiamente, devido ao atraso no diagnóstico, podendo desenvolver formas mais graves da doença.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Aprimorar e padronizar o sistema BacFil de filtração versão 6.0, além de avaliar seu desempenho em amostras de lavado broncoalveolar.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Para o desenvolvimento da nova versão do sistema BacFil:
 - a. Verificar se existe diferença na visualização de bacilos álcool-ácido resistentes em membranas brancas e pretas;
 - b. Verificar se o aumento no volume de solução digestora, acréscimo de pérolas de vidro e mudança no sistema do suporte do pré-filtro melhoram a passagem de amostras pelo sistema de filtração;
 - c. Avaliar a melhor forma de fixação da membrana de filtração em lâmina de microscopia;
 - d. Avaliar o limite de detecção de bacilos álcool-ácido resistentes da técnica de filtração.
- 2) Avaliar a utilização do sistema BacFil para detecção de BAAR em amostras de lavado broncoalveolar.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA DO ESTUDO

4.1.1 Delineamento

Corte transversal comparativo de dois métodos de concentração de amostras (filtração pelo sistema BacFil e centrifugação) com o método padrão-ouro para diagnóstico de TB (cultura).

4.1.2 Local

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

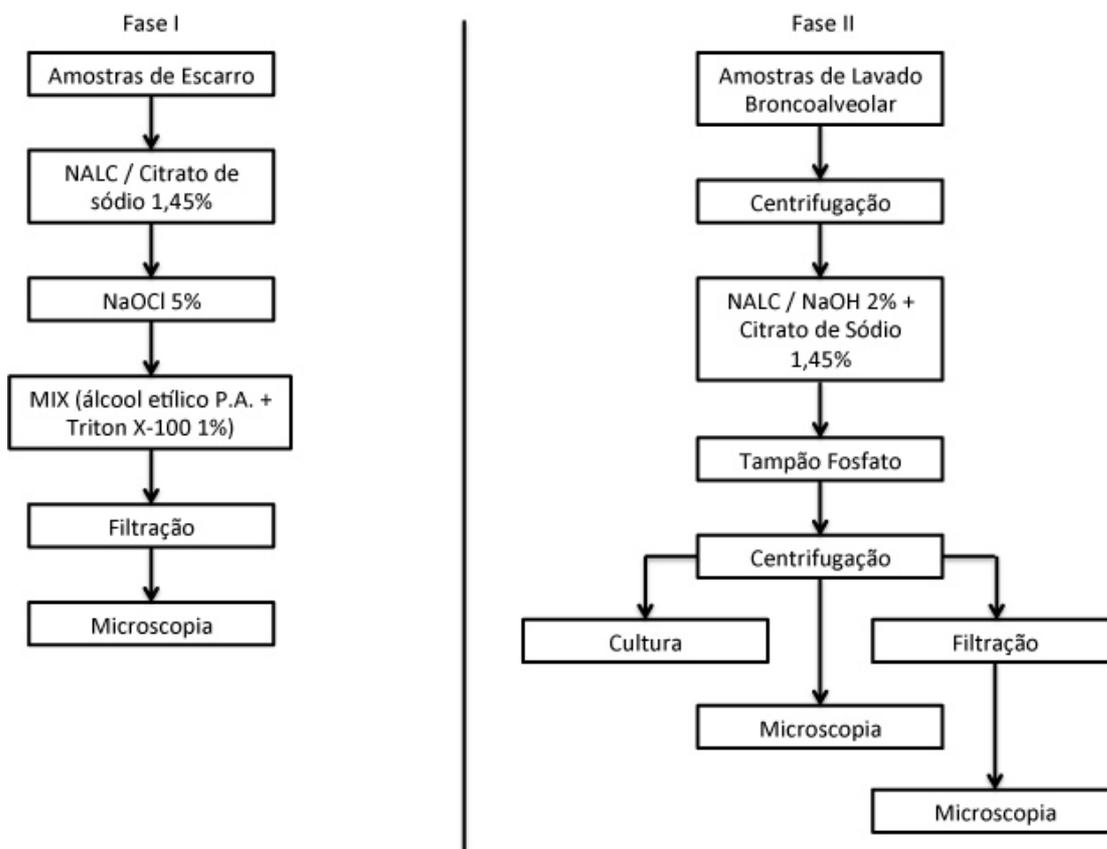
4.1.3 Desenho

O presente estudo foi dividido em duas fases. A primeira fase consistiu no aperfeiçoamento e padronização do sistema BacFil, gerando uma nova versão (6.0). Para tanto foram analisadas: a possibilidade de utilização de um novo sistema de suporte de pré-filtro baseado em orifícios de 1mm de diâmetro; utilização de membrana branca corada por Auramina-O; aumento do volume da solução digestora e utilização de pérolas de vidro no processo de digestão das amostras de escarro e limite de detecção da técnica de filtração. Além disso, foi testada a possibilidade de modificação na concentração de NaOCl para ajudar na passagem de maior volume de amostra (2mL) pelo sistema de filtração. A segunda fase consistiu na avaliação do sistema BacFil versão 6.0 através da comparação dos resultados de microscopia obtidos após filtração com os resultados de cultura e baciloscopia após centrifugação, utilizando amostras de lavado broncoalveolar.

4.1.4 Critérios de Inclusão

- Amostras de escarro espontâneo e LBA de pacientes previamente cadastrado no ambulatório de Pneumologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Morais (HUCAM) da UFES;
- Amostras de pacientes liberadas para descarte pela rotina do laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES;
- Volume mínimo de 1mL após utilização pela rotina do laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES.

4.1.5 Fluxograma de Processamento de Amostras



4.2 ENSAIOS PARA APRIMORAMENTO DO SISTEMA DE FILTRAÇÃO

4.2.1 Amostras

Nessa etapa, foram utilizadas amostras de escarro espontâneo selecionadas entre as amostras enviadas ao laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES para diagnóstico de TB. Todas as amostras foram utilizadas após a realização dos procedimentos de rotina.

4.2.2 Comparação de visualização de bacilos em membranas brancas e pretas (MILLIPORE – ISOPORE™ MEMBRANE FILTERS)

Devido ao fato de as membranas pretas, anteriormente utilizadas para lâminas de filtração coradas por Auramina-O (FENNELLY *et al.*, 2012), terem sido descontinuadas pelo fabricante, foi testada a possibilidade de realizar baciloscopia após filtração em membranas brancas (MILLIPORE – ISOPORE™ MEMBRANE FILTERS) e corá-las pela técnica de Auramina-O.

O ensaio foi realizado utilizando 4 amostras com resultado de baciloscopia positiva e 4 amostras com resultado de baciloscopia negativa, previamente identificadas pelo laboratório de rotina do NDI/UFES. Cada amostra foi dividida em duas alíquotas de 1mL, passando pelos procedimentos de filtração descritos a seguir no item 4.3. Uma alíquota seguiu com passagem através da membrana branca e outra da membrana preta. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.2.3 Aumento do volume de solução digestora (NALC / citrato de sódio) e adição de pérolas de vidro

O método de digestão utilizado por Fennelly e colaboradores (2012) para digestão de amostras de escarro consistia na adição de solução digestora de NALC / Citrato de Sódio na concentração de 25g/mL, no volume referente a 10% do volume da

amostra, deixando a solução agir por 15 minutos com homogeneização em vórtex a cada 5 minutos (método 1). Nós propusemos o aumento do volume da solução digestora para 50% do volume da amostra e acréscimo de 8 a 10 pérolas de vidro, seguindo o processamento como descrito a seguir no subitem 5.3.2 (método 2).

Para realizar a comparação dos diferentes tipos de processamento de amostras, foram analisadas 57 amostras processadas pelos métodos 1 e 59 amostras processadas pelo método 2.

4.3 FILTRAÇÃO

4.3.1 Montagem do sistema de filtração BacFil Versão 6.0

As peças externas dos *holders* do sistema BacFil versão 6.0 foram produzidas em aço inox, dividido em duas partes principais: 1) parte superior composta por duas peças cilíndricas onde fica disposto o pré-filtro, o suporte de polipropileno com sistema de orifícios e *o-rings* (Figura 2) e 2) parte inferior composta por uma peça menor onde fica disposta a membrana, seu suporte em aço inox e *o-rings* (Figura 3).

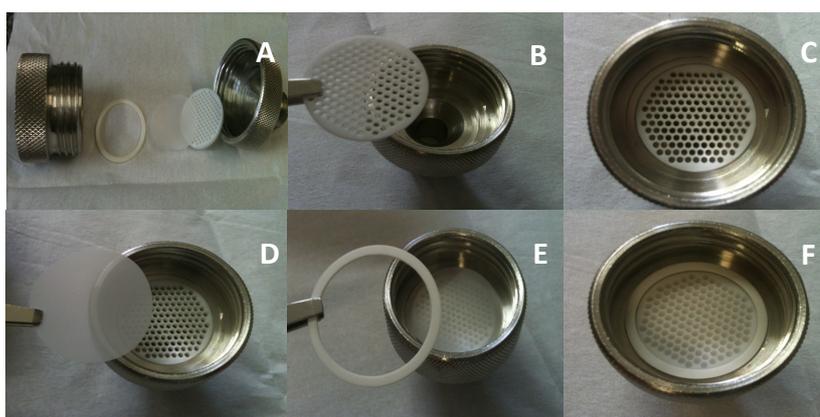
4.3.2 Descontaminação e fluidificação das amostras para realização da filtração

A descontaminação foi realizada com NaOCl 5%. Foi adicionado volume referente a duas vezes o volume inicial da amostra em temperatura ambiente por 15 minutos (homogeneizando em vórtex por aproximadamente 15 segundos a cada 5 minutos). Para evitar a perda da atividade do cloro e, portanto, perda do seu poder de descontaminação, a solução de NaOCl 5% foi preparada no dia do experimento e armazenada em frasco âmbar estéril até sua utilização. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de uma solução de etanol 95% / Triton 1%. As misturas finais foram mantidas à temperatura ambiente até a filtração.

4.3.3 Filtração das amostras

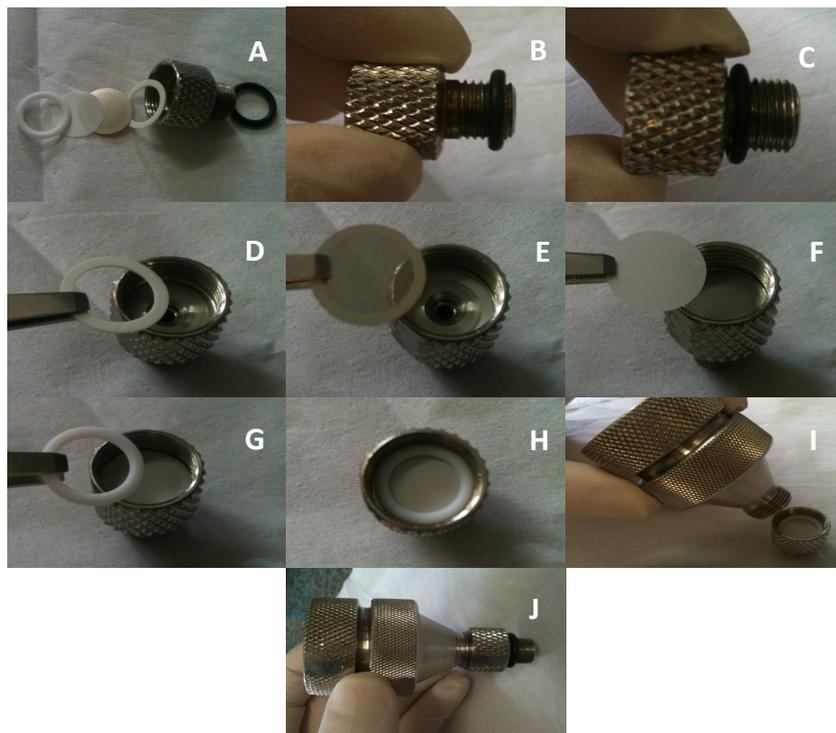
Os tubos contendo as amostras processadas permaneceram fechados até o acoplamento, um a um, do sistema de *holders* neles. Dessa forma, foi minimizada a possibilidade de contaminação cruzada. Após acoplados ao sistema de *holders*, os tubos foram vertidos e encaixados, um a um, em um aparelho cilíndrico de alumínio com saída para uma bomba de vácuo (Figura 5). As amostras foram pré-filtradas através de uma membrana de nylon (Millipore™ – Billerica, MA – USA) de 25mm com poros de 30 μ m adaptada em um suporte de polipropileno de fabricação própria com sistema de orifícios cada um medindo 1mm de diâmetro. Na próxima etapa do sistema de *holders*, as amostras foram filtradas através de membranas brancas de policarbonato (Osmonics^{INC} – Minnetonka, MN – EUA) de 13mm, com poros de 0,8 μ m adaptadas em um suporte de aço inox. O protótipo cilíndrico de alumínio possui uma saída para uma bomba de vácuo que aplica uma pressão negativa constante de 5mmHg no sistema até o tempo máximo estipulado de 10 min.

Após a passagem de cada amostra, sua respectiva torneira foi fechada e, após a passagem de todas as amostras, as membranas de filtração foram retiradas uma a uma com o auxílio de uma pinça (Millipore™ – Billerica, MA – EUA) e uma agulha de biópsia e dispostas em lâmina de microscópio previamente identificadas (Figura 4).



A) Peças de aço inox, *o-rings*, pré-filtro e suporte de pré-filtro. B) suporte de pré-filtro com sistema de orifícios de 1mm cada. C) suporte de pré-filtro encaixado na peça de inox. D) pré-filtro de nylon de 25mm de diâmetro com poros de 30 μ m. E) *o-ring* para acomodação e fixação do pré-filtro no suporte. F) parte superior do sistema montada.

Figura 3. Peças da parte superior do *holder* do sistema de filtração.



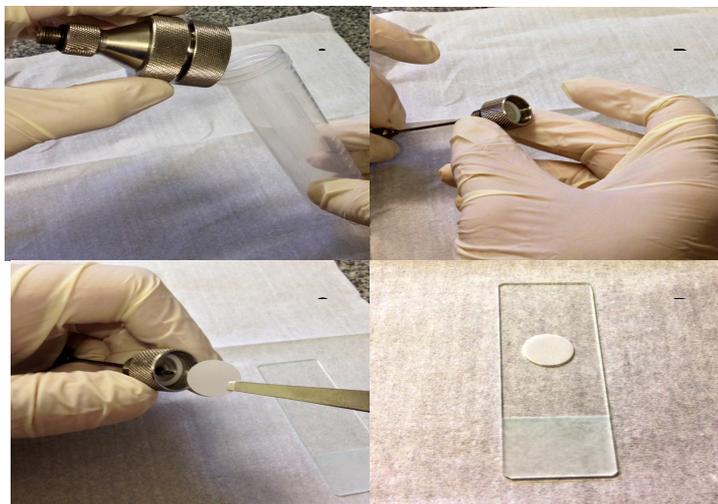
A) Peça e suporte de membrana de aço inox, *o-rings* e membrana de policarbonato com poros de 0,8 μ m. B) e C) encaixe do *o-ring* preta no inferior da peça de aço inox que encaixa no protótipo. D) *o-ring* de acomodação do suporte da membrana. E) suporte em aço inox da membrana de policarbonato. F) membrana de policarbonato com poros de 0,8 μ m. G) *o-ring* para acomodação e fixação da membrana no suporte. H) parte inferior do sistema montada. I) e J) conexão das duas partes do sistema.

Figura 4. Peças da parte inferior do *holder* do sistema de filtração e *holder* completo.



A) e B) acoplamento do sistema de *holders* no tubo contendo amostra processada. C) acoplamento do sistema de *holders* com o tubo contendo amostra no protótipo de aço inox. D) sistema de filtração BacFil versão 6.0 completo.

Figura 5. Acoplamento do *holder* no tubo de centrifuga, acoplamento das duas partes de aço inox e sistema de filtração BacFil versão 6.0 completo



A) acoplamento do *holder* de aço inox completamente montado no tubo de centrifuga de 50mL contendo a amostra processada. B) retirada da membrana de policarbonato após passagem da amostra pelo sistema com auxílio de agulha de biópsia. C) retirada da membrana do suporte da membrana de aço inox com auxílio de pinça. D) acomodação da membrana de filtração em lâmina de microscopia.

Figura 6. Acoplamento do *holder* no tubo de centrifuga, processo de retirada do membrana do *holder* e acomodação da mesma na lâmina de microscopia.

4.3.4 Fixação das membranas de filtração em lâminas de microscopia

Após os procedimentos de filtração, as membranas foram retiradas do sistema com o auxílio de uma pinça e uma agulha cirúrgica e dispostas em lâminas para microscopia. Após fixadas, as lâminas devem ser coradas, entretanto, o processo de coloração demanda que o material em análise esteja fixo na lâmina, pois os reagentes utilizados são lavados com água corrente. Dessa forma foram propostas estratégias para fixar as membranas na lâmina de microscopia.

4.3.4.1 Utilização de pinça

Utilizou-se pinça da empresa MilliporeTM (Billerica, MA – EUA) para segurar a membrana de filtração na lâmina de microscopia durante o processo de coloração, sendo utilizada uma para cada membrana, evitando assim contaminação cruzada.

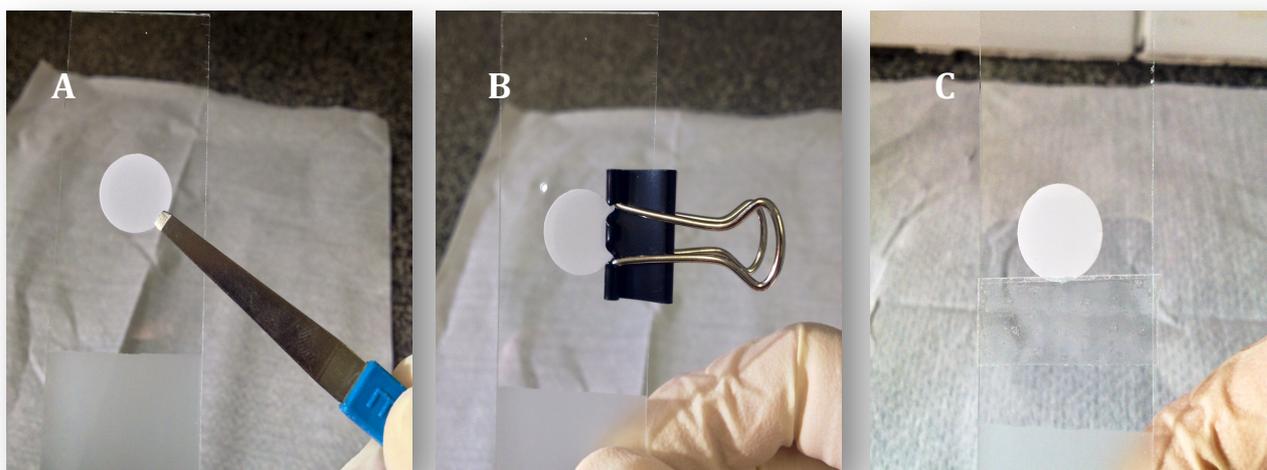
4.3.4.2 Utilização de prendedores de corpo metálico e alças de aço inoxidável

Para tentar minimizar o manuseio das lâminas, foi proposta a utilização de prendedores de papel do tipo “blinder clips” de 15mm (BACCHI – Cotia, SP) com corpo metálico e alças de aço inoxidável.

4.3.4.3 Utilização de fita dupla face

Uma nova estratégia de fixação da membrana de filtração na lâmina de microscopia foi proposta de forma a evitar o escorrimento do corante por partes sobressalentes, além de evitar a perda da membrana no ato de coloração nas etapas de lavagem com água corrente. Foi então analisada a possibilidade de utilização de fita dupla face (SCOTCH® - 3M) de 12mm de espessura, disposta na lâmina de microscopia, sendo a membrana fixada a ela somente na área onde não há passagem de amostra, pois é a parte de alocação da *o-ring* de fixação.

A disposição dos três materiais utilizados para fixação da membrana na lâmina de microscopia está ilustrada na Figura 7.



A) utilização de pinça metálica. B) utilização de prendedor de corpo metálico e alças de aço inoxidável. C) utilização de fita dupla face.

Figura 7. Fixação da membrana de filtração em lâmina de microscopia para coloração.

4.3.5 Coloração e leitura das lâminas

As lâminas contendo as membranas de filtração foram fixadas em chapa aquecedora a 80°C por 10 minutos e coradas pela técnica de Auramina-O. A análise semiquantitativa das lâminas de filtração foi realizada em microscópio Olympus BX40F-3 (Olympus Optical Company, Tóquio, Japão). A área total da membrana de filtração foi analisada pelos leitores.

A leitura das lâminas de filtração foi realizada por dois técnicos distintos e, na presença de discrepância de resultados, um terceiro técnico realizava a leitura sendo o seu resultado considerado como verdadeiro.

4.3.6 Limite de detecção da técnica de filtração pelo sistema BacFil versão 6.0

Foi realizado teste para analisar o limite de detecção da técnica de filtração através de passagem de diluições seriadas pelo sistema, comparando com cultura quantitativa.

Para tanto, utilizou-se suspensão bacteriana de concentrações conhecidas onde a absorbância foi ajustada em espectrofotômetro para densidade ótica (D.O.) de 0,250 ± 0,01 a 625nm (Espectrofotômetro Microprocessado Visível Digital Bivolt modelo Q 798DRM) em 3 ensaios independentes.

Após ajustada a D.O., foram realizadas diluições seriadas de 10, 100, 1000, 100000, 1000000 e 10000000 em tubo de hemólise transferindo-se 0,3mL da diluição anterior em 2,7mL de NaCl 0,9% m/v e Tween[®] 0,25% v/v (Figura 8).

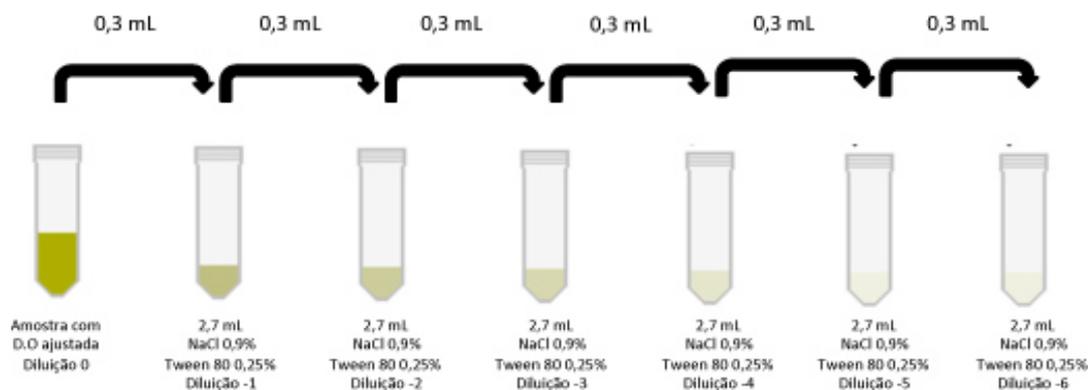


Figura 8. Esquema diluição seriada.

Um mililitro do restante foi adicionado a um novo tubo de centrífuga de 50mL, no qual foi adicionado 2mL de NaOCl 5%, deixando agir por 15 minutos (descontaminação) com posterior adição de 3mL da solução de Triton X100 1% / Álcool P.A (5 minutos). Após decorrido esses passos, a mistura foi submetida à filtração em membrana de policarbonato com posterior coloração das membranas de filtração pelo método de Auramina-O.

Para controle do inóculo e quantificação de bactérias na suspensão preparada para o ensaio, realizou-se cultura quantitativa onde dois inóculos de 30µL da suspensão principal (0) e de todas as diluições (-1, -2, -3, -4, -5 e -6) foram inoculados em meio Middlebrook 7H11. Todas as placas foram incubadas por 21 dias em estufa a 37°C para contagem de colônias (Figura 9).

A suspensão bacteriana foi realizada utilizando cepa de referência *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC[®] 27294[™]), anteriormente subcultivada em meio Ogawa-Kudoh e incubada por 14 dias em estufa a 37°C.

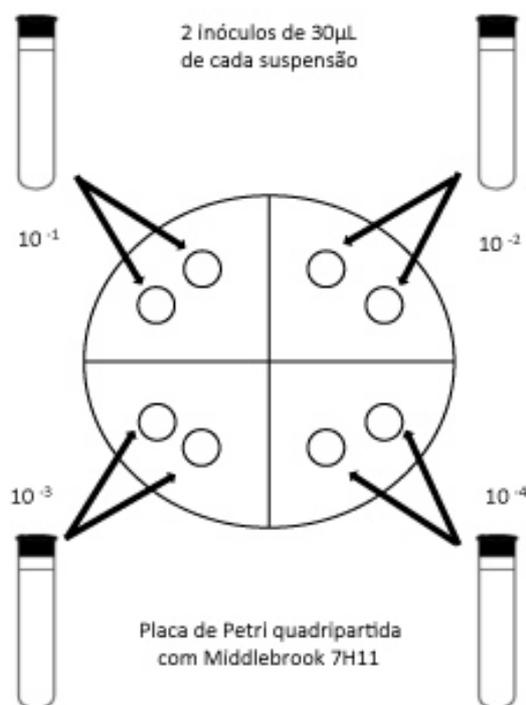


Figura 9. Esquema do controle do inóculo em meio Middlebrook 7H11

Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas com o auxílio de lupa. A diluição que apresentou crescimento bacteriano entre 10 e 100 colônias visíveis foram escolhidas para cálculo do número de micobactérias. O número de colônias na diluição escolhida foi, então, corrigido de acordo com a diluição e expresso em UFC/mL por meio da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL da diluição} = \frac{\text{n}^\circ \text{ colônias em } 60 \mu\text{L} \times 16,7 (1000 \mu\text{L}/60 \mu\text{L})}{\text{diluição}}$$

Após ajustada a concentração de bacilos de acordo com a diluição, foi verificada a quantidade de bacilos de acordo com o exemplo a seguir:

$$\text{Diluição } 0 = 1 \times 10^4 \text{ UFC/mL} = 1 \text{ bacilo na diluição } -4$$

De acordo com a concentração corrigida de bacilos nas diluições seriadas, foi verificada a quantidade de bacilos encontradas na membrana de filtração da respectiva diluição.

4.3.7 Aumento da concentração de NaOCl para melhoria na fluidificação das amostras de escarro (teste para aumento do volume de amostra)

Com o intuito de aumentar a sensibilidade da técnica de filtração pelo sistema BacFil versão 6.0, foi proposto o aumento do volume de escarro utilizado de 1mL para 2mL. Para que isso fosse possível sem que ocorresse a saturação da membrana de policarbonato pelos *debris* presentes nas amostras de escarro, foi proposto o aumento na concentração de NaOCl no processamento das amostras. Para tal propósito, foram testadas duas concentrações de NaOCl: 6% e 10%.

Um total de 12 amostras foi digerido utilizando a técnica descrita no subitem 5.3.2. Após esse processamento, as amostras foram aliqüotadas em 4 tubos de centrífuga de 50mL, sendo que em dois tubos foram adicionados 1mL de amostra e nos outros dois foram adicionados 2mL da amostra. Desse ponto em diante a descontaminação, fluidificação e filtração ocorreu do mesmo modo descrito nos subitens 5.3.2 e 5.3.3 mudando somente as concentrações de NaOCl, como mostra a Figura 10.

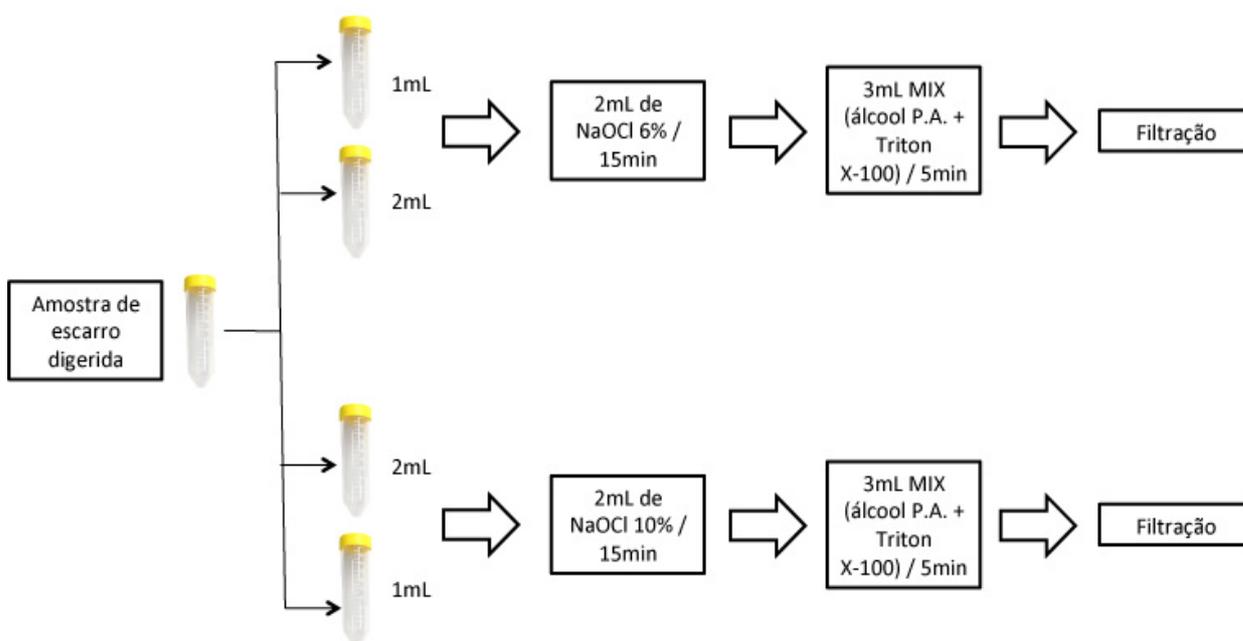


Figura 10. Processamento de amostras de escarro utilizando 1mL e 2mL de amostras com diferentes concentrações de NaOCl (6% e 10%).

4.3.8 Análise da influência do tempo de exposição e uso de diferentes concentrações de NaOCl na visualização de BAAR na membrana de filtração

Com o intuito de analisar se o aumento da concentração de NaOCl traria prejuízos à visualização de bacilos na membrana de filtração, foi realizado teste comparando a visualização dos mesmos após exposição ao NaOCl 5% e 10% em tempos previamente determinados, como mostra a Figura 11.

Um total de 3 amostras positivas com resultado de baciloscopia 3+ e 3 amostras positivas com resultado de baciloscopia 1+ foram aliqüotadas em 12 tubos de centrifuga de 50mL (0,5mL em cada tubo). Em 6 tubos foi adicionado 1mL de NaOCl 5% e nos outros 6 tubos foi adicionado 1mL de NaOCl 10%. Os tubos foram deixados em repouso a temperatura ambiente pelos tempos determinados de 10, 20, 30, 40 e 50 minutos, sendo que o sexto tubo serviu como controle da amostra positiva sem adição de NaOCl. Foi então adicionado tampão fosfato até completar o volume de 50mL, seguiu-se com centrifugação a 3.000 x g por 15 minutos e então, 3 gotas do sedimento foram dispostas em lâmina de microscopia. Estas foram coradas pela técnica de Auramina-O e a leitura foi realizada em microscópio de fluorescência.

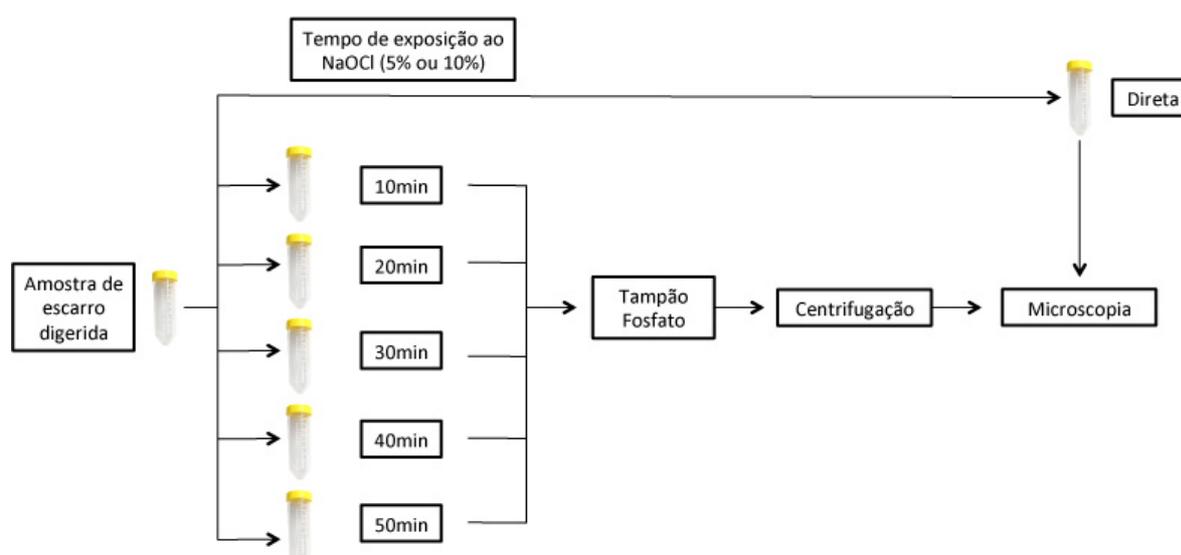


Figura 11. Tempo de exposição das amostras de escarro ao NaOCl em diferentes concentrações (5% e 10%).

4.4 AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE FILTRAÇÃO BacFil VERSÃO 6.0 PARA AMOSTRAS DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

4.4.1 Amostras

Foram analisadas 113 amostras de LBA de pacientes com suspeita de TB provenientes do Ambulatório de Pneumologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) e encaminhadas para o Laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES. Destas, 10 amostras foram excluídas da análise pois obtiveram resultado de cultura contaminada e 2 amostras foram excluídas da análise pois não passaram pelo sistema de filtração, impossibilitando a comparação dos métodos, restando um total de 101 amostras (Figura 12).

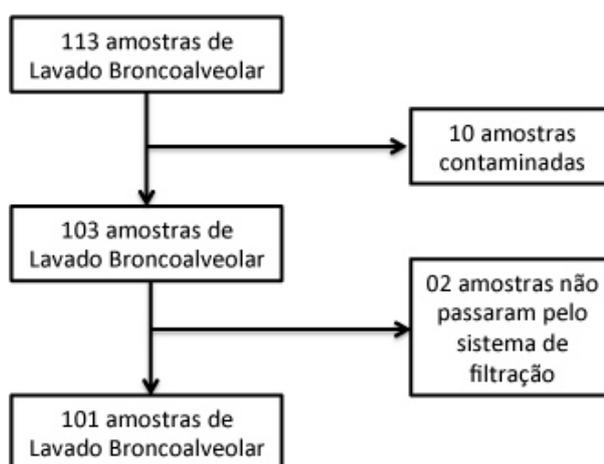


Figura 12. Fluxograma de seleção de amostras de LBA para análise.

4.4.2 Exame microscópico de lavado broncoalveolar (LBA)

As amostras de lavado broncoalveolar foram pré-tratadas segundo as recomendações do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias do Ministério da Saúde (2008). Esse pré-processamento consiste na centrifugação da amostra a 3.000 x g por 15 minutos, com posterior descarte do sobrenadante, obtendo um sedimento de amostra concentrada de LBA.

Após o pré-tratamento, as amostras foram processadas pelo método de NALC/NaOH que consiste na adição do mesmo volume da solução de NALC/NaOH

(0,25g/50mL) em tubo de centrífuga de 50mL contendo a amostra. Após 15 minutos, completou-se o volume da mistura (amostra/solução) para 50mL com tampão fosfato e centrifugou a 3.000 x g por 15 minutos. Ao sair da centrífuga, o sobrenadante foi descartado e 2 gotas do sedimento (200µL) ressuspendido foram adicionados à lâmina de microscopia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

4.4.3 Cultura

Para comparar a sensibilidade e especificidade do método de filtração, foi realizada cultura das amostras de LBA em meio de Ogawa e MGIT. Quatro gotas (ou 0,2mL) do ressuspendido obtido após o processamento descrito no subitem 4.4.2 foram inoculadas em meio Ogawa.

Um total de 29 das 113 amostras de LBA foram inoculadas também em meio líquido para automação (BACTEC MGIT 960). Para tanto, 0,5mL do ressuspendido obtido após o processamento descrito no subitem 4.4.2 foi adicionado em tubo de BACTEC MGIT 960 contendo 0,8mL de PANTA 2x. A concentração de PANTA foi aumentada com o intuito de reduzir a contaminação por outras bactérias, como previamente descrito por Peres e colaboradores (2011).

As culturas em meio O-K foram incubadas em estufa a 37°C e examinadas semanalmente para verificação de crescimento microbiano. Os tubos de MGIT foram incubados no equipamento MGIT 960 até a sinalização de positivo ou por até 6 semanas. Após 8 semanas de incubação, todas as culturas (O-K e BACTEC MGIT 960) que não apresentaram crescimento de micobactérias foram consideradas negativas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

4.4.3.1 Identificação dos bacilos

Para culturas com crescimento de micobactérias em meio Ogawa foi realizada análise fenotípica baseada nas características morfológicas, pigmentação e tempo de crescimento. Além disso, nas amostras positivas em meio Ogawa e/ou MGIT, foi realizado teste imunocromatográfico TB Ag MPT64 Test BioEasy (MASTER

DIAGNÓSTICA) que identifica microrganismos pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT).

Para tal propósito, 100µL de colônias crescidas em Ogawa ressuspendido em tampão de extração do kit ou 100µL da cultura líquida (MGIT) foram aplicadas na fita de nitrocelulose do cassete. A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (MASTER DIAGNÓSTICA, São Paulo, SP).

4.4.4 Filtração

Após centrifugação, 1mL da amostra de LBA foi separado e submetido ao processo de filtração, realizado de acordo com os itens 4.3.2 a 4.3.4. Os ensaios foram executados com o sistema de filtração BacFil versão 6.0, ou seja, utilizando o suporte de pré-filtro com sistema de orifícios, volume ajustado de solução digestora, utilização de 8 a 10 pérolas de vidro e utilização de membranas brancas.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados foram armazenados em um banco de dados específico, criado no programa Microsoft EXCEL 2010 e posteriormente analisados pelo programa STATA 12.0 (Stata Corporation, College Station, EUA). Para análise comparativa entre os métodos de baciloscopia foi realizada o teste de McNemar. Foi estabelecido um intervalo de confiança para diferença de proporções de 95%.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

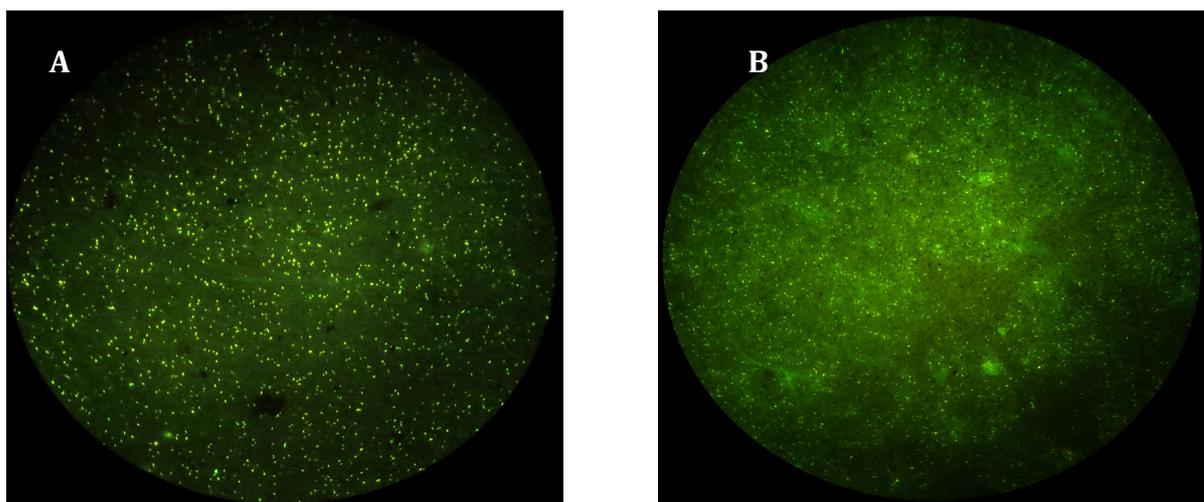
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes com o protocolo 639.555 na data de 29/10/2013.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 COMPARAÇÃO DA DETECÇÃO DE BAAR EM DIFERENTES MEMBRANAS

Para verificar se a membrana branca poderia ser utilizada para detecção de BAAR com a mesma eficiência da membrana preta, foram realizados ensaios independentes nos quais 4 amostras de escarro com resultado de baciloscopia 3+ e 4 amostras com resultado de baciloscopia negativa foram submetidas ao processo de filtração. Todas as membranas foram coradas pela técnica de Auramina-O. O resultado da análise microscópica semi-qualitativa está demonstrado na Figura 13. Verificou-se que não houve diferença na observação de BAAR fluorescentes nos dois tipos de membranas (brancas e pretas).



A) visualização de BAAR corados pela técnica de fluorescência com Auramina-O em membrana branca de policarbonato. B) visualização de BAAR corados pela técnica de fluorescência com Auramina-O em membrana preta de policarbonato.

Figura 13. Comparação da visualização de BAAR em membranas brancas e pretas coradas pelo método de Auramina-O.

5.2 FIXAÇÃO DAS MEMBRANAS DE FILTRAÇÃO EM LÂMINAS DE MICROSCOPIA

A melhor forma de fixação das membranas de filtração em lâminas de microscopia foi por intermédio da utilização de fita dupla face, pois seu uso evita o manuseio da membrana com a pinça, o que poderia levar ao rompimento da integridade da

mesma, e a vazamento dos corantes por partes sobressalentes, como ocorria ao utilizar os prendedores metálicos.

5.3 AUMENTO DO VOLUME DE SOLUÇÃO DIGESTORA (NALC / CITRATO DE SÓDIO), ADIÇÃO DE PÉROLAS DE VIDRO E MUDANÇA NO SUPORTE DO PRÉ-FILTRO PARA SISTEMA DE ORIFÍCIOS

Para avaliar se a modificação proposta em relação ao aumento do volume de solução digestora, adição de pérolas de vidro e utilização de suporte de pré-filtro com sistema de orifícios ajudaria na passagem de amostras de escarro pelo sistema de filtração, realizou-se experimento no qual 57 amostras de escarro foram processadas pelo método anteriormente utilizado por Fennelly e colaboradores em 2012 (método 1) e 59 amostras foram processadas utilizando o método modificado (método 2).

A análise demonstrou que somente 1 amostra (2%) não passou totalmente pelo sistema de filtração quando utilizou-se o método 2, ao passo que 8 (14%) amostras não passaram pelo sistema de filtração utilizando a técnica de digestão das amostras utilizada por Fennelly e colaboradores (2012) (Gráfico 1).

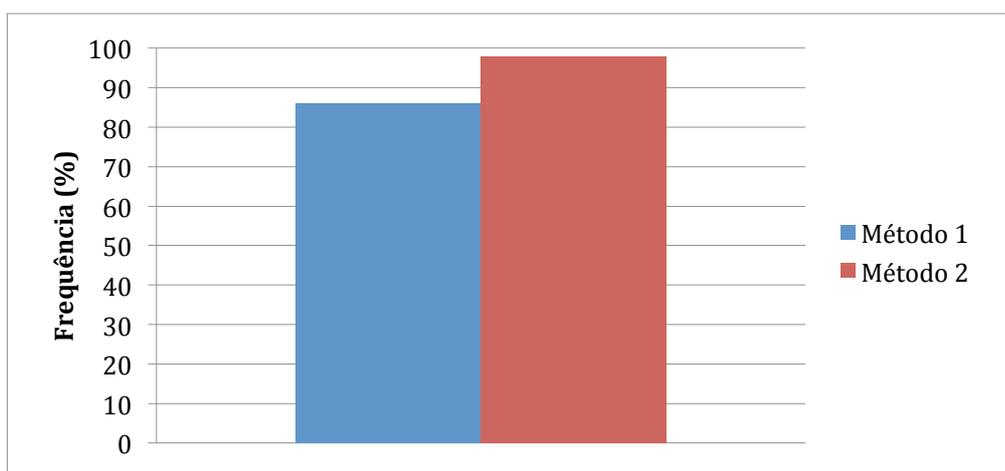


Gráfico 1. Comparação da frequência de passagem de amostras de escarro pelo sistema BacFil Versão 6.0 utilizando amostras de escarro processadas pelo método proposto por Fennelly e colaboradores (2012) e pelo método modificado pelo grupo do NDI/UFES.

Para efetuar a análise baciloscópica nas membranas, foram excluídas as amostras que não passaram totalmente pelo sistema de filtração. Dessa forma, para o método

1, um total de 49 amostras foram analisadas. Verificou-se que 6 amostras que obtiveram resultado positivo na baciloscopia direta apresentaram resultado negativo após filtração. Fato que não foi identificado quando utilizou-se o método 2. A única amostra que não passou totalmente pelo sistema de filtração quando utilizado o método 2 também foi excluída desta análise, restando um total de 58 amostras (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre diferentes métodos de processamento de amostras e baciloscopia direta

	Baciloscopia Direta	Filtração	
		POS	NEG
Método 1	POS	4	6
	NEG	2	37
Método 2	POS	4	0
	NEG	1	53

5.4 LIMITE DE DETECÇÃO DA BACILOSCOPIA EM MEMBRANAS DE FILTRAÇÃO - SISTEMA BacFil VERSÃO 6.0

Com o intuito de determinar o limite de detecção de BAAR em membranas submetidas ao sistema de filtração, foram realizados 3 ensaios independentes diluindo-se uma solução de concentração bacteriana conhecida, medida em espectrofotômetro, até a ordem de 10^{-6} e submetendo-as ao processo de filtração. Os resultados desses ensaios estão ilustrados na Tabela 2. Nela consta que a baciloscopia da membrana de filtração detectou BAAR nas mesmas diluições em que se obteve UFC na cultura quantitativa.

Tabela 2. Limite de detecção de BAAR pela baciloscopia em membrana de filtração. Análise comparativa em modelo experimental com cultura quantitativa.

	Ensaio 1 5,3 x 10 ⁴ UFC/mL)*	Ensaio 2 (9,2 x 10 ⁵ UFC/mL)*	Ensaio 3 (1,4 x 10 ⁵ UFC/mL)*
Diluição	-4	-5	-5
Cultura Quantitativa (UFC)	5	9	2
Baciloscopia semi-quantitativa (BAAR)	2	1	1

* Concentração de BAAR na suspensão bacteriana inicial.

5.5 AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOCl PARA MELHORIA NA FLUIDIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ESCARRO

Para verificar a contribuição do aumento da concentração de NaOCl no êxito da passagem de amostras pelo sistema de filtração, foram testadas duas concentrações de NaOCl (6% e 10%). Quando utilizado somente 1mL de amostra de escarro, observou-se que em ambas as concentrações de NaOCl a performance foi semelhante (92% para NaOCl 6% e 83% para NaOCl 10%). Ao aumentar o volume de amostra (2mL), verificou-se que somente 7 (58%) das 12 amostras de escarro passaram pelo sistema de filtração utilizando NaOCl 6%, ao passo que a frequência de passagem de amostras pelo sistema utilizando NaOCl 10% não foi alterada, ou seja, permaneceu em 83%, representando 2 amostras que não passaram completamente pelo sistema de filtração (Gráfico 2).

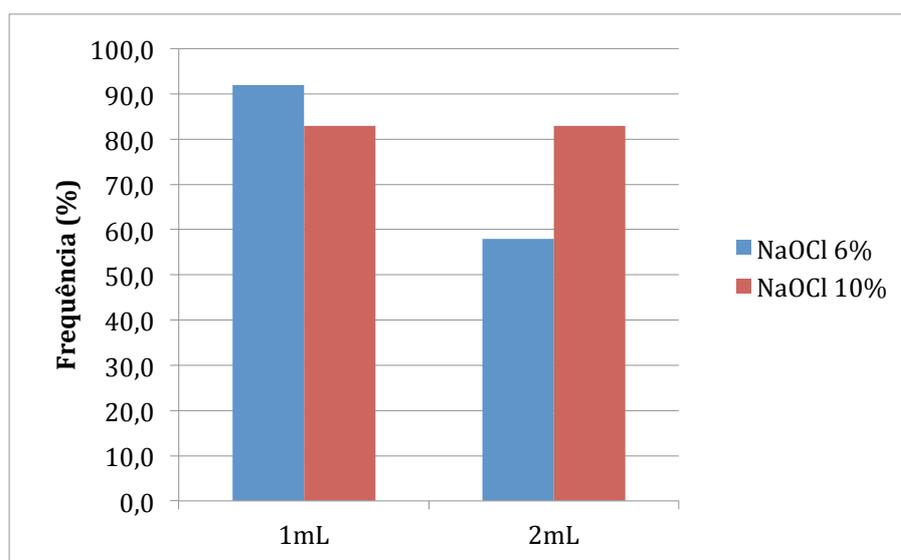


Gráfico 2. Frequência de passagem de amostras de escarro pelo sistema de filtração quando utilizadas duas concentrações diferentes de NaOCl (6% e 10%) no processamento de amostras de escarro.

5.6 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaOCl NA VISUALIZAÇÃO DE BAAR NA MEMBRANA DE FILTRAÇÃO

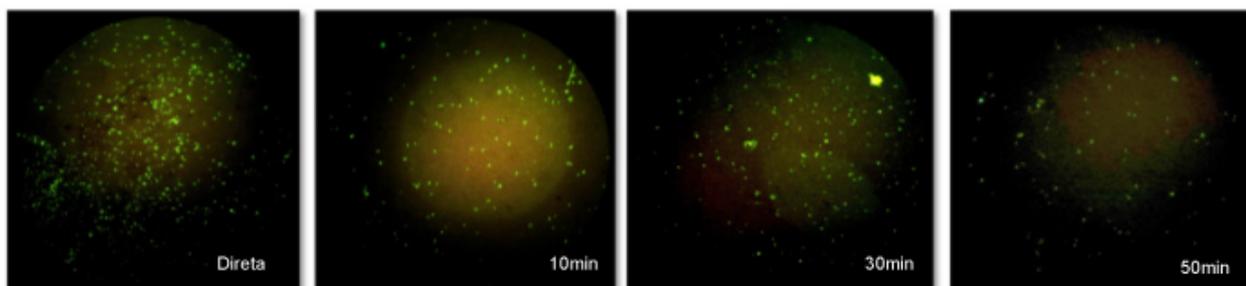
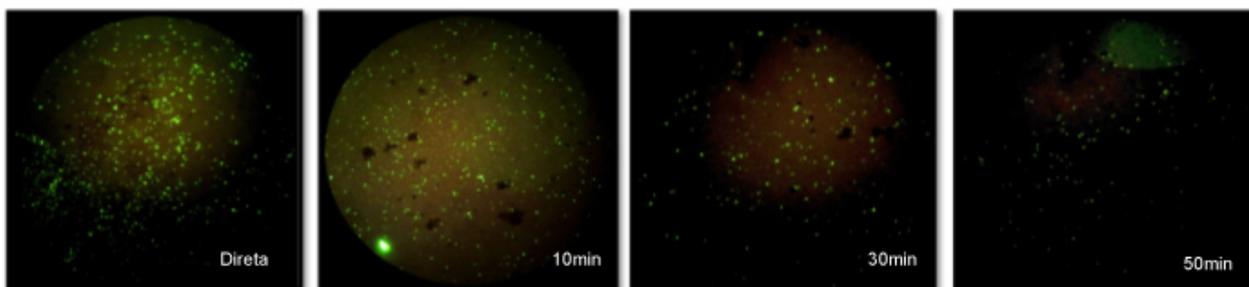
Após verificar que o aumento na concentração de NaOCl para 10% ajudaria na fluidificação das amostras de escarro, resultando na melhoria da passagem de maior volume de amostra (2mL) pelo sistema de filtração, foi realizado um ensaio para

verificar se o tempo necessário para a realização de todas as etapas do processo de filtração após a adição de NaOCl diminuiria a quantidade de BAAR na membrana. O processo total de filtração leva em média de 35 a 40 minutos, porém a amostra só permanece em contato com o NaOCl por 25 a 30 minutos.

As amostras de escarro foram expostas ao NaOCl por 10, 20, 30, 40 e 50 minutos e, após tamponadas e centrifugadas, o sedimento deu origem a lâminas que foram coradas pelo método de Auramina-O.

A análise semi-quantitativa das membranas de filtração das amostras com resultado de baciloscopia 3+ demonstrou que, para as alíquotas processadas com NaOCl 5%, só foi observada diminuição considerável na quantidade de BAAR em todas as amostras a partir de 40 minutos, enquanto que para as alíquotas processadas com NaOCl 10% já foi verificada diminuição da quantidade de BAAR a partir de 20 minutos de exposição em duas das 3 amostras (Figura 14).

NaOCl 5%



NaOCl 10%

Figura 14. Comparação da visualização de BAAR em membranas de filtração após diferentes tempos de exposição ao NaOCl nas concentrações de 5% e 10%

Nas membranas das amostras com resultado de baciloscopia 1+, foi verificado que após 50 minutos de exposição ao NaOCl 5%, em 2 das 3 amostras foram encontrados menos de 10 BAAR em 100 campos, ou seja, resultado negativo. Para as alíquotas processadas com NaOCl 10%, as 3 amostras com resultado de baciloscopia 1+ obtiveram resultado negativo após 20 minutos de exposição (de 1 a 9 bacilos em 100 campos) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Análise da baciloscopia semi-quantitativa das membranas de filtração de amostras de escarro com resultado de baciloscopia direta 3+.

Tempo de Exposição		Concentração	
		NaOCl 5%	NaOCl 10%
10min	Amostra 1	3+	3+
	Amostra 2	3+	3+
	Amostra 3	3+	3+
20min	Amostra 1	3+	3+
	Amostra 2	3+	3+
	Amostra 3	3+	3+
30min	Amostra 1	3+	2+
	Amostra 2	3+	2+
	Amostra 3	3+	3+
40min	Amostra 1	2+	2+
	Amostra 2	2+	2+
	Amostra 3	2+	2+
50min	Amostra 1	2+	1+
	Amostra 2	2+	2+
	Amostra 3	2+	2+

Tabela 4. Análise da baciloscopia semi-quantitativa das membranas de filtração de amostras de escarro com resultado de baciloscopia direta 1+.

Tempo de Exposição		Concentração NaOCI	
		5%	10%
10min	Amostra 1	1+	1+
	Amostra 2	1+	1+
	Amostra 3	1+	1+
20min	Amostra 1	1+	5 BAAR
	Amostra 2	1+	8 BAAR
	Amostra 3	1+	8 BAAR
30min	Amostra 1	1+	6 BAAR
	Amostra 2	1+	9 BAAR
	Amostra 3	1+	2 BAAR
40min	Amostra 1	1+	NEG
	Amostra 2	1+	NEG
	Amostra 3	1+	2 BAAR
50min	Amostra 1	1+	NEG
	Amostra 2	6 BAAR	NEG
	Amostra 3	9 BAAR	NEG

5.7 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA DE FILTRAÇÃO, SISTEMA BacFil VERSÃO 6.0 PARA AMOSTRAS DE LAVADO BRONCOALVEOLAR

Um total de 113 amostras de LBA foram processadas e nelas realizados os procedimentos de filtração, cultura e baciloscopia após centrifugação. Destas, 10 obtiveram resultado de cultura contaminada e 02 não passaram pelo sistema de filtração sendo excluídas das análises. As 101 amostras restantes foram utilizadas para análise de sensibilidade e especificidade da técnica de filtração utilizando o sistema BacFil versão 6.0. Os resultados estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Sensibilidade e especificidade do exame de baciloscopia em amostras de lavado broncoalveolar após filtração pelo método BacFil versão 6.0.

		CULTURA		SENSIBILIDADE (%)*	ESPECIFICIDADE (%)
		POS	NEG		
BACILOSCOPIA APÓS CENTRIFUGAÇÃO	POS	10	1	59%	99%
	NEG	7	83		
FILTRAÇÃO	POS	13	4	76%	95%
	NEG	4	80		

* $p = 0,001$

A sensibilidade e especificidade da baciloscopia de membranas de filtração pelo método BacFil versão 6.0 em amostras de LBA foi de 76% e 95%, respectivamente, enquanto que a sensibilidade e especificidade da baciloscopia após centrifugação foi de 59% e 99%, respectivamente.

Considerando o intervalo de confiança de 95%, a sensibilidade da baciloscopia em membrana de filtração utilizando o sistema BacFil versão 6.0 foi significativamente maior do que a baciloscopia após centrifugação em amostras de LBA (OR: 0,076; IC 95% = 0,001 – 0,512; $p = 0,001$).

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico precoce da TB é essencial para o controle adequado da doença, pois possibilita o início do tratamento reduzindo, dessa forma, a capacidade do paciente transmitir a doença para indivíduos susceptíveis.

Com o intuito de alcançar melhores taxas de detecção a doença, a WHA lançou em 1991 uma meta de 70% de detecção de casos novos com baciloscopia positiva e cura de 85% daqueles detectados. Se essas metas fossem alcançadas, a incidência de TB seria reduzida de 5% a 10% ao ano em locais livres do HIV. Entretanto, até o ano de 2000 a taxa de detecção de novos casos não passou de 27%, o que levou a organização a aprovar uma nova resolução em 2005 na qual defendia o financiamento sustentável para controle e prevenção da TB (ONOZAKI & RAVIGLIONE, 2010). Em 2006, foi lançado o segundo Plano Global de Combate a TB, sustentando o apoio a pesquisa de novas técnicas de diagnóstico que auxiliem na detecção de novos casos (WHO, 2006).

Desde então, novas tecnologias vem sendo desenvolvidas e aprimoradas para o diagnóstico da TB. Atualmente, a técnica de diagnóstico molecular Xpert MTB/RIF, que possibilita a detecção de MTB e resistência à rifampicina, é uma das metodologias mais pesquisadas. Possui sensibilidade e especificidade altas quando realizadas em amostras de pacientes com resultado de baciloscopia positiva (98,2% e 99,2% respectivamente). Entretanto, apresenta resultado de sensibilidade baixo quando testados em amostras com resultado de baciloscopia negativa e cultura positiva (72,5%). Outras desvantagens da ainda técnica são: alto custo, necessidade de pessoal qualificado e resultados controversos em relação a sua utilização em amostras extrapulmonares (BOHEME *et al.*, 2010 ; LAWN *et al.*, 2013).

Por esses motivos acima citados, o teste molecular Xpert MTB/RIF ainda não pode ser implantado em todos os laboratórios que necessitam realizar o diagnóstico da TB, principalmente porque a grande maioria dos pacientes com tuberculose (90%) residem em países em desenvolvimento, onde os recursos são limitados e o diagnóstico é feito principalmente pela baciloscopia (DYE *et al.*, 2005).

Essa técnica, por sua vez, é rápida, de simples execução e de baixo custo, porém sua principal desvantagem é a baixa sensibilidade que varia entre 20% e 80% (STEINGART *et al.*, 2006). Para superar os problemas relacionados à baixa sensibilidade do exame de baciloscopia, métodos de concentração de amostras são frequentemente utilizados. Dentre esses, a filtração constitui um dos mais promissores por dispensar o uso de centrífuga, por sua simplicidade, rapidez de execução, e supostamente por sua maior sensibilidade (SMITHWICK & STRATIGOS, 1981).

Levando-se em consideração estes atributos e ainda visando aprimorá-los, várias modificações metodológicas foram propostas ao longo do tempo até o advento das duas últimas versões, uma utilizada por Fennelly e colaboradores (2012), que alcançaram uma sensibilidade de 89%, e outra utilizada por Quincó e colaboradores (2013), que reportaram uma sensibilidade 81,9% para pacientes HIV-negativos.

Apesar dos dois autores terem relatado aumento significativo da sensibilidade da técnica de filtração em relação à baciloscopia direta e após centrifugação, existiam ainda problemas metodológicos que precisavam ser solucionados. Dessa forma, nos propusemos neste estudo aprimorar e padronizar o sistema BacFil de filtração, além de avaliar seu desempenho em amostras de lavado broncoalveolar. Os resultados e os aspectos relacionados ao aprimoramento e padronização do sistema BacFil versão 6.0 serão abordados a seguir. Para tornar a discussão mais didática, esta será realizada em tópicos.

É possível realizar o processo de filtração utilizando membranas de policarbonato branca, sendo estas coradas pela técnica de Auramina-O?

Neste ensaio foram testadas membranas brancas e pretas da empresa MILLIPORE – ISOPORE™ MEMBRANE FILTERS, utilizando 4 amostras com resultado de baciloscopia positivas e 4 amostras com resultado de baciloscopia negativas. Esse primeiro ensaio foi realizado devido à descontinuidade da produção das membranas pretas pelo fabricante.

Fennelly e colaboradores, em 2012, utilizaram os dois tipos de membranas, brancas e pretas. Nas membranas brancas eles realizaram coloração a frio de Kynioun e nas membranas pretas, coloração de Auramina-O, seguindo as recomendações do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, do Ministério da Saúde (2008). Os autores realizaram os dois processos de coloração pois os métodos que utilizam fluorescência são em média 10% mais sensíveis do que o método tradicional utilizando a coloração por Ziehl-Neelsen (STEINGART *et al.*, 2006a). Entretanto, os autores não constataram diferença na sensibilidade das duas técnicas de coloração (FENNELLY *et al.*, 2012).

Nos experimentos conduzidos no presente estudo não foram observadas diferenças na análise semi-quantitativa das membranas brancas e pretas. Resultado contrário seria esperado pois, teoricamente, as membranas pretas proveriam um fundo mais escuro, facilitando assim a visualização de BAAR fluorescentes.

No processamento e filtração das amostras pelo Sistema BacFil versão 6.0, quais foram as alterações realizadas em relação às outras versões e quais as consequências dessas alterações?

A primeira alteração metodológica proposta neste estudo foi o aumento da solução digestora (NALC 0,25g / Citrato de sódio 1,45%) que anteriormente era utilizada no volume referente a 10% do volume da amostra (FENNELLY *et al.*, 2012 ; QUINCÓ *et al.*, 2013), para 50% do volume da amostra. Além de adicionar a essa etapa 8 a 10 pérolas de vidro e modificação do suporte do pré-filtro para sistema de orifícios.

Os resultados obtidos foram discordantes daqueles relatados por Moraes em 2009, em que foi demonstrado que o aumento da solução digestora para volume igual ao da amostra desfavoreceu o processo de filtração, tornando-o mais lento. No nosso estudo, verificou-se que após as modificações propostas, 98% das amostras passaram pelo sistema de filtração dentro do tempo determinado de 10 minutos. Quincó e colaboradores (2013) relataram que, utilizando a versão 4.0, um total de 10% das amostras não passaram pelo sistema de filtração. Os melhores resultados obtidos no presente estudo podem ser explicados pelas alterações realizadas no

processamento da amostra e pelas alterações do suporte do pré-filtro, que anteriormente contava com canaletas para dar vazão ao líquido, e agora conta com um sistema de orifícios, cada um com 1mm de diâmetro. Essa alteração pode proporcionar melhor fluxo do líquido da primeira etapa do sistema de *holders* para a segunda parte, onde está a membrana de filtração.

Em relação a análise das membranas de filtração das amostras testadas pelo método utilizado por Fennelly e colaboradores (2012), foi possível verificar que 6 amostras que obtiveram resultado de baciloscopia direta positivo, foram negativas na baciloscopia após filtração pelo sistema BacFil. Uma possível explicação para esses resultados falso-negativos é que os bacilos da TB tendem a formar grumos (IEVEN & GOOSSENS, 1997), dessa forma, um processamento de amostra e um sistema de vazão de líquidos ineficazes, poderiam levar a retenção desses grumos na parte do superior do sistema de *holders*, onde fica alocado o pré-filtro.

O aumento da concentração de NaOCl permitiria o aumento do volume de amostra para 2mL sem o comprometimento na visualização de BAAR fluorescentes na membrana de filtração?

O uso de NaOCl como adjuvante no processo de liquefação de escarro é o procedimento mais estudado dentre os processos químicos de digestão de amostras, pois este reagente pode ser encontrado facilmente em quase todos os locais (ÄNGEBY *et al.*, 2004), possui ótimo poder desinfetante (BEST *et al.*, 1990) e tem ação sobre muco e *debris* resultando em lâminas de microscopia mais limpas (BONNET *et al.*, 2008).

Devido a grande quantidade de matéria orgânica presente nas amostras de escarro, nosso grupo de pesquisa verificou, em uma análise preliminar, que ao ser utilizado 2mL de escarro para filtração pelo sistema BacFil versão 6.0, aproximadamente 80% das amostras não passavam pelo sistema (dados não mostrados). Tendo em vista que a solução digestora utilizada no processamento das amostras (NALC/Citrato de sódio) já estava sendo utilizada em volume 5 vezes maior do que o utilizado por outros autores (FENNELLY *et al.*, 2012 ; QUINCÓ *et al.*, 2013), o aumento da

concentração de NaOCl (10%) foi a opção escolhida para tentar liquefazer um maior volume de amostras de escarro para utilização no processo de filtração.

A análise dos resultados demonstrou que com aumento da concentração de NaOCl, 83% das amostras passaram eficientemente pelo sistema de filtração. Entretanto, o exame microscópico das membranas de filtração após exposição ao NaOCl 10% demonstrou que seu uso poderia prejudicar a visualização de BAAR fluorescentes, pois em amostras de escarro com resultados de baciloscopia positivas foi observada uma diminuição de BAAR na análise semi-quantitativa.

Embora mais eficiente no processo de digestão de amostra, o NaOCl a 10% não poderia ser utilizado em razão do seu efeito deletério sobre os BAAR. Assim sendo, mantivemos a concentração de NaOCl a 5%. Para assegurar que esta concentração não causaria nenhum efeito deletério sobre os BAAR, avaliamos sua influência na visualização de BAAR nas membranas de filtração em tempo pré-determinados (10, 20, 30, 40 e 50 minutos).

No processo de filtração, as amostras ficam em contato com o NaOCl por até 30 minutos e, na análise dos resultados, verificamos que nas amostras de escarro com resultados 1+ e 3+, não houve diminuição da quantidade de BAAR nas membranas de filtração expostas ao NaOCl 5% até 50 e 40 minutos, respectivamente.

Dados semelhantes foram demonstrados por Yassin e colaboradores (2003). Os autores relataram que após 60 minutos de exposição ao NaOCl 5%, há uma perda gradual na visualização de BAAR em lâminas de escarro. Githiu e colaboradores (2007), após confrontar amostras positivas a duas concentrações de NaOCl diferentes (3,5% e 5%) por até 24 horas relataram que, para NaOCl 5%, o tempo necessário para esterilizar as amostras é de aproximadamente 15 horas. Relatou também que o NaOCl 3,5% apresenta uma ação de imobilização sobre o MTB por até 3h e que após esse tempo, com a perda de eficiência do cloro, o MTB volta a ser viável. Chew e colaboradores (2011) relataram que o tempo necessário para esterilizar amostras de escarro utilizando NaOCl 10% é de aproximadamente 5 minutos, e que o processo de concentração de amostra utilizando NaOCl por

sedimentação *overnight* reduz a quantidade de BAAR nas lâminas de microscopia, principalmente em amostras que possuem maior carga bacilar.

Qual o limite de detecção de BAAR em membranas de policarbonato utilizando a filtração pelo sistema BacFil versão 6.0 como sistema de concentração de amostras?

Kent & Kubica (1985) relataram que o limite de detecção de BAAR em amostras de escarro utilizando método convencional de microscopia pela técnica de Ziehl-Neelsen é de 5.000 a 10.000 BAAR por mililitro de amostra de escarro. No primeiro estudo relacionado à filtração de amostras de escarro conduzido por Smithwick & Stratigos (1981), os autores relataram que o limite de detecção da técnica seria 30 BAAR por mL de amostra, quantidade 20 vezes menor do que seria necessário para obter uma lâmina de baciloscopia após centrifugação positiva. Mais recentemente, em 2003, Birnbaum & Fennelly conduziram um experimento em que foram capazes de detectar 2 a 3 bacilos em 50 campos microscópicos utilizando suspensão bacteriana de *M. smegmatis* contendo de 10 a 100 bacilos por mililitro. Em nossos experimentos, ao utilizarmos suspensões de MTB com concentrações conhecidas e diluídas seriadamente até a ordem 10^{-6} , foi possível observar BAAR na membrana de filtração nas diluições em que haviam de 2 a 9 BAAR por mL de suspensão.

Apesar de não podermos extrapolar o limite de detecção da técnica de filtração utilizando o sistema BacFil encontrado neste estudo para amostras biológicas, pois a suspensão bacteriana não representa a realidade, os resultados obtidos indicam que a técnica pode apresentar limites de detecção comparáveis até mesmo aos encontrados no exame de cultura, que apresentam um limite de detecção de 10 a 100 BAAR/mL de escarro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Outras metodologias ainda mais sensíveis, baseadas na amplificação de ácidos nucleicos tais como PCR (Amplicor), apresentam limite de detecção entre 4 a 42 CFU/mL de escarro (YAJKO *et al.*, 1995), e o Xpert[®] MTB/RIF que possui um limite de detecção na ordem de 131 UFC/mL de escarro (HELB *et al.*, 2010).

Qual a sensibilidade e especificidade da técnica de filtração de amostras de escarro utilizando o sistema BacFil versão 6.0 em amostras de lavado broncoalveolar?

Amostras paucibacilares como LBA são utilizadas para o diagnóstico de TB pulmonar em pacientes que possuem evidências radiográficas da doença, porém são incapazes de produzir escarro e/ou possuem sucessivos resultados de baciloscopia negativos (BROWN *et al*, 2007). Por apresentarem baixa carga bacilar, constituem um excelente alvo para avaliação da acurácia de novas metodologias. Em 2000, Rizvi e colaboradores (2000), realizando baciloscopia de LBA de pacientes com resultado prévio de baciloscopia de escarro negativo, detectaram TB em 90% dos casos. Outros autores obtiveram resultados mais modestos, como Fujii e colaboradores (1992) e Okutan e colaboradores (2003) que detectaram MTB em amostras de LBA em 34% e 51,7%, respectivamente.

Em nosso estudo verificamos um aumento significativo ($p = 0,001$) na sensibilidade da técnica de baciloscopia após concentração de amostras de LBA pelo sistema BacFil versão 6.0 (76%) em relação a sensibilidade da técnica de baciloscopia após centrifugação (59%). Dois estudos conduzidos no Rio de Janeiro por Conde e colaboradores, um realizado em 1999 e o outro em 2000, demonstraram sensibilidade da baciloscopia após centrifugação inferior ao encontrado por nosso grupo de pesquisa, sendo 32,6% e 38,1%, respectivamente.

A elevada sensibilidade da técnica de baciloscopia após concentração de amostras pelo sistema BacFil versão 6.0 nesse estudo foi similar a sensibilidade do exame de cultura de micobactérias relatado por outros pesquisadores com amostras de LBA. Yajko e colaboradores (1994) relataram sensibilidade de 71% da cultura utilizando amostras de pacientes com resultados de baciloscopia positiva, enquanto Okutan e colaboradores (2003) obtiveram sensibilidade 81% utilizando amostras de pacientes com resultados de baciloscopia negativo.

Em estudos realizados com versões anteriores do sistema BacFil em amostras de escarro, a sensibilidade mostrou-se muito variável. Fennelly e colaboradores (2012),

relataram uma sensibilidade de 89%, já Quincó e colaboradores (2013) obtiveram sensibilidade de 81,8% para pacientes HIV negativos e 61,9% para pacientes HIV positivos. Entretanto, em um ensaio clínico realizado em Uganda por Jones-López e colaboradores (2014), os autores relataram sensibilidade de 48,5%, da técnica de filtração com o sistema BacFil versão 5.0, bem inferior a sensibilidade da técnica de baciloscopia direta (60,9%) e após centrifugação (63,3%). Os autores relatam alguns fatores que podem ter contribuído para os resultados inferiores da filtração em relação às outras metodologias, entre eles está o procedimento adotado para alcançar o volume necessário de 5mL de amostra para a realização de todos os métodos diagnósticos. No realizado por Jones-López e colaboradores, em amostras com volume inferior a 5mL foi adicionado água mili-Q estéril até completar o volume de 5mL. Segundo os autores, esse procedimento e o tipo da população estudada (pacientes hospitalizados, maioria HIV positivos), pode ter comprometido os resultados da filtração e afirmam que os resultados não devem ser extrapolados para outras populações.

No nosso estudo foi relatada uma diminuição na especificidade da técnica de baciloscopia utilizando o sistema de filtração BacFil versão 6.0 em relação a técnica de baciloscopia após centrifugação (95% e 99%, respectivamente). Quincó e colaboradores (2013) ao avaliar a versão 4.0 do sistema de filtração obtiveram especificidade de 96,7% para pacientes HIV positivos e 94,9% para pacientes HIV negativos, entretanto, outros autores não relataram essa diminuição (FENNELLY *et al.*, 2012 ; JONES-LÓPEZ *et al.*, 2014). Para explicar isto, Smithwick & Stratigos relataram em seu experimento que as amostras identificadas como falso-positivas eram provenientes de pacientes em tratamento. Isso poderia explicar porque Jones-López e colaboradores (2014) não encontraram diminuição da especificidade da técnica de filtração em relação à baciloscopia direta e após centrifugação, pois, estar em tratamento consistia um dos fatores de exclusão do estudo.

Diante do exposto, podemos constatar que os ajustes realizados no sistema BacFil resultaram em maior eficiência no processo de filtração de amostras, maior simplicidade operacional e satisfatória sensibilidade na detecção de BAAR, sobretudo em relação a baciloscopia após centrifugação, que é o método

recomendado pela OMS. Acreditamos que os benefícios resultantes da utilização da filtração pelo sistema BacFil associados à rapidez e à simplicidade do protocolo da técnica, viabilizem a incorporação da mesma à rotina de laboratórios de micobacteriologia, principalmente em locais onde a baciloscopia ainda constitui a principal metodologia utilizada para o diagnóstico da TB.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- 1) Uma nova versão do sistema BacFil foi desenvolvida e denominada de versão 6.0. O processamento das amostras foi padronizado utilizando solução digestora de NALC / citrato de sódio (25g/mL) no volume referente a 50% do volume da amostra e adição de 8 a 10 pérolas de vidro. O suporte do pré-filtro foi modificado para conter orifícios de 1mm de diâmetro cada, e a alternativa para sustentação da membrana de filtração na lâmina de microscopia foi a utilização de fita dupla face. As membranas brancas (MILLIPORE – ISOPORE™ MEMBRANE FILTERS) foram utilizadas para a visualização de BAAR após filtração, sendo estas coradas pela técnica de Auramina-O. Essas alterações possibilitaram uma frequência de 98% de passagem de amostras de escarro pelo sistema.
- 2) O limite de detecção da técnica de filtração utilizando o sistema BacFil versão 6.0 foi de 2 a 9 BAAR por mL de suspensão bacteriana de MTB H₃₇Rv (ATCC® 27294™).
- 3) A utilização de NaOCl 10% no processo de filtração se mostrou deletéria às micobactérias, pois a permanência do agente em contato com amostras positivas pelo tempo necessário para realização da técnica provoca perda de BAAR nas membranas de filtração.
- 4) A sensibilidade da baciloscopia em membrana de filtração utilizando o sistema BacFil versão 6.0 foi significativamente maior do que a baciloscopia após centrifugação em amostras de LBA. Julgamos contudo, que novos estudos devam ser realizados para demonstrar a reprodutibilidade e sensibilidade diagnóstica da técnica, principalmente em amostras paucibacilares.

8. PERSPECTIVAS

Aprimorar o sistema de filtração BacFil para utilização de maior volume de amostra com o intuito de aumentar ainda mais a sensibilidade da técnica de baciloscopia.

Referências

9. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, K. A., LAVER, P. N., MICHEL, A. L., WILLIAMS, M., VAN HELDEN, P. D., WARREN, R. M., VAN PITTIUS N. C. G. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. **Emerg Infect Dis**, v.16, n.8, Aug, p.1296-1299. 2010.

ALFRED, N., LOVETTE, L., ALIYU, G., OLUSEGUN, O., MESHAK, P., KILANG, T., IWAKUN, M., NNAMDI, E., OLUBUNMI, O., DAKUM, P., ABIMIKU, A. Optimising *Mycobacterium tuberculosis* detection in resource limited settings. **BMJ**, v.29, Apr. 2014.

APERS, L., MUTSVANGWA, J., MAGWENZI, J., CHIGARA, N., BUTTERWORTH, A., MASON, P., VAN DER STUYFT, P. A comparison of Direct Microscopy, the Concentration Method and the Mycobacteria Growth Indicator Tube for the Examination of Sputum for Acid-Fast Bacilli. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.7, n.4, Apr, p.376-381. 2003.

ÄNGEBY, K. A., HOFFNER, S. E., DIWAN, V. K. Should the 'Bleach Microscopy Method' be Recommended for Improved Case Detection of Tuberculosis? Literature Review and Key Person Analysis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.8, n.7, Jul, p.806-815. 2004.

BENNEDSEN, J., LARSEN, S. O. Examination for Tubercle Bacilli by Fluorescence Microscopy. **Scand J Respir Dis**, v.47, n.2, p.114-120. 1966.

BEST, M., SATTAR, S. A., SPRINGTHORPE, V. S., KENNEDY, M. E. Efficacies of Selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Microbiol**, v.28, n.10, p.2234-2239. 1990.

BOHEME, C. C., NABETA, P., HILLEMANN, D., NICOL, M. P., SHENAI, S., KRAPP, F., ALLEN, J., TAHIRLI, R., BLAKEMORE, R., RUSTOMJEE, R., MILOVIC, A., JONES, M., O'BRIEN, S., PERSING, D.H., RUESCH-GERDES, S., GUTOZZO, E.,

RODRIGUES, C., ALLAND, D., PERKINS, M. D. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. **NEJM**, v.363, n.11, Sep, p.1005-1015. 2010.

BONNET, M., RAMSAY, A., GITHUI, W., GAGNIDZE, L., VARAINE, F., GUERIN, P. J. Bleach Sedimentation: An Opportunity to Optimize Smear Microscopy for Tuberculosis Diagnosis in Settings of High Prevalence of HIV. **Clin Infect Dis**, v.1, n.46(11), Jun. 2008.

BIRNBAUM, L., FENNELLY, K. P. Improving the Sensitivity of Microscopy to Detect Mycobacteria. **Am J Resp Crit Care Med**, v.167: A710 (abstract). 2003.

BROWN, M., VARIAL, H., BASSETT, P., DAVIDSON, R. N., WALL, R., PASVOL, G. Prospective Study of Sputum Induction, Gastric Washing, and Bronchoalveolar Lavage for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Patients Who are Unable to Expectorate. **Clin Infect Dis**, v.44, n.11, Jun. 2007.

CAMBANIS, A., RAMSAY, A., WIRKOM, V., TATA, E., CUEVAS, L.E. Investing Time in Microscopy: An Opportunity to Optimise Smear-Based Case Detection of Tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.11, n.1, Jan, p.40-45. 2007.

CATTAMANCHI, A., DAVIS, J. L., PAI, M., HUANG, L., HOPEWELL, P. C., STEINGART, K. R. Does Bleach Processing Increase the Accuracy of Sputum Smear Microscopy for Diagnosing Pulmonary Tuberculosis? **J Clin Microbiol**, v.48, n.7, Jul, p.2433-2439. 2010.

CEPHEID. Two-Hour Detection of MTB and Resistance to Rifampicin. **Brochure: Xpert[®] MTB/RIF**. Sunnyvale. Disponível em: <<http://www.cepheid.com/media/files/eu/brochures/XpertMTB`Broch`R9`EU.pdf>>. Acesso em: 25 de Julho de 2014

CHAN, E. D., HEIFETS L., ISEMAN M. D. Immunologic Diagnosis of Tuberculosis: A Review. **Tuber Lung dis**, v.80, n.3, p.131-140. 2000.

CHEW, R., CALDERÓN, C., SCHUMACHER, S. G., SHERMAN, J. M., CAVIEDES, L., FUENTES, P., CORONEL, J., VALENCIA, T., HERRERA, B., ZIMIC, M.,

HUAROTO, L., SABOGAL, I., ESCOMBE, A. R., GILMAN, R. H., EVANS, C. A. Evaluation of Bleach-Sedimentation for Sterelising and Concentrating Mycobacterium Tuberculosis in sputum Specimens. **BMC Infect Dis**, v.11, n.269. 2011.

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. **JMM**, v.47, n.9, p.821-827. 1998.

CONDE, M. B., DOARES, S. L., MELLO, F. C., REZENDE, V. M., ALMEIDA, L. L., REINGOLD, A. L., DALEY, C. L., KRITSKI, A. L. Comparison of Sputum Induction With Fiberoptic Bronchoscopy in the Diagnosis of Tuberculosis: Experience at an Acquired Immune Deficiency Syndrome Reference Center in Rio de Janeiro, Brazil. **Am J Respir Crit Care Med**, v.162, n.6, Dec, p.2238-2240. 2000.

CONDE, M. B., FIGUEIRA, C. M., MORAES, R., FONSECA, L. S., DERIEMER, K., KRITSKI, A. L. Predictive Value of the Acid Fast Smear for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Specimens in a Reference Center of HIV/AIDS in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.94, v.6, p.787-790. 1999.

CRUCIANI, M., SCARPARO, C., MALENA, M., BOSCO, O., SERPELLONI, G., MENGOLI, C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, With or Witout Solid Media, for Detection of Mycobacteria. **J Clin Microbiol**, v.42, n.5, May, p.2321-2325. 2004.

DELOGU, G., SALI, M., FADDA, G. The Biology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v.5, n.1, Nov. 2013.

DIETZE, R., HADAD, D. J., PEREIRA F. E. L., RODRIGUES R. R. Tuberculose. In: ROCHA, M. O. C., PEDROSO E. R. P. (Eds). **Fundamentos em Infectologia**. Editora Rubio, Rio de Janeiro, p.703-738. 2009.

DINNES J., DEEKS J., KUNST H., GIBSON A., CUMMINS E., WAUGH N., DROBNIIEWSKI F., LALVANI A. A Systematic review of Rapid Diagnostic Tests for the Detection of Tuberculosis Infection. **Health Technol Assess**, v.11, n.3, Jan, p.1-196. 2007.

DYE, C., WATT, C. J., BLEED, D. M., HOSSEINI, S. M., RAVIGLIONE, M. C. Evolution of Tuberculosis Control and Prospects for Reducing Tuberculosis Incidence, Prevalence and Deaths Globally. **JAMA**, v.293, n.22, Jun, p.2767-2775. 2005.

FENNELLY, K. P., MORAIS, C. G., HADAD, D. J., VINHAS, S., DIETZE, R., PALACI, M. The Small Membrane Filter Method of Microscopy to Diagnose Pulmonary Tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v.50, n.6, Jun, p.2096-2099. 2012.

FIUZA DE MELO, F. A., AFIUNE J. B., KRITSKI A. I., SEISCENTO M., HIJJAR M. A. Tuberculose. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. (Eds). **Tratado de Infectologia**. Atheneu, São Paulo, p.914-959. 1996.

FUJII, H., ISHIHARA, J., FUKAURA, A., KASHIMA, N., TAZAWA, H., NAKAJIMA, H., IDE, H., TAKAHASHI, T. Early Diagnosis of Tuberculosis by Fibreoptic Bronchoscopy. **Tuber Lung Dis**, v.73, n.3, Jun, p.167-169. 1992.

FURIN, J. J., JOHNSON, J. L. Recent Advances in the Diagnosis and Management of Tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**, v.11, n.3, May, p.189-194. 2005.

GARAY, S. M., Pulmonary Tuberculosis. In: ROM W. N., GARAY S. (Eds). **Tuberculosis**. Lippincott Williams & Wilkins, Estado Unidos, p.345-394. 2004.

GENG, E., KREISWIRTH, B., BURZYNSKI, J., SCHLUGER, N. W. Clinical and Radiographic Correlates of Primary and Reactivation Tuberculosis: A Molecular Epidemiology Study. **JAMA**, v.293, n.22, Jun, p.2740-2745. 2005.

GRANJE, J. M. Mycobacterial Diseases in the World: Yesterday, Today and Tomorrow. In: RADLADGE, C., STANFORD, J., GRANJE, J.M. (Eds). **The Biology of the Mycobacteria**. Academic Press, Londres, p.3-36. 1989.

HÄNSCHEID, T. The Future Looks Bright: Low-Cost Fluorescent Microscopes for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Coccidia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.102, n.6, Jun, p.520-521. 2008.

HELB, D., JONES, M., STORY, E., BOEHME, C., WALLACE, E., HO, K., KOP, J., OWENS, M. R., RODGERS, R., BANADA, P., SAFI, H., BLAKEMORE, R., LAN, N. T., JONES-LÓPEZ, E. C., LEVI, M., BURDAY, M., AYAKAKA, I., MUGERWA, R. D., MCMILLAN, B., WINN-DEEN E., CHRISTEL, L., DAILEY, P., PERKINS, M. D., PERSING, D. H., ALLAND, D. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistant by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. **J Clin Microbiol**, v.48, n.1, Jan. 2010.

HUEBNER, R. E., GOOD, R. C., TOKARS, J. I. Current Practices in Mycobacteriology: Results of a Survey of State Public Health Laboratories. **J Clin Microbiol**, v.31, n.4, Apr, p.771-775. 1993.

IEVEN, M., GOOSENS, H. Relevance of Nucleic Acid Amplification Techniques for Diagnosis of Respiratory tract Infections in the Clinical Laboratory. **Clin Microbiol Rev**, v.10, n.2, Apr, p.242-256. 1997.

IWAMOTO, T., SONOBE, T., HAYASHI, K. Loop-mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. **J Clin Microbiol**, v.41, n.6, Jun, p.2616-2622. 2003.

JEONG, Y. J., LEE, K. S. Pulmonary Tuberculosis: Up-to-Date Imaging and Management. **AJR Am J Roentgenol**, v.191, n.3, Sep, p.834-844. 2008.

JONES-LÓPEZ, E., MANABE, Y.C., PALACI, M., KAYIZA, C., ARMSTRONG, D., NAKIYINGI, L., SSENGOOBA, W., GAEDERT, M., KUBIAK, R., ALMEIDA JÚNIOR, P., ALLAND, D., DIETZE, R., JOLOBA, M., ELLNER, J. J., DORMAN, S. E. Prospective Cross-Selectional Evaluation of the Small Membrane Filtration (SMF) Method for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v.7, May. 2014

KENT, P. T., KUBICA G. P. **Public Health Mycobacteriology – A Guide for Level III Laboratory**. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985. (publication n° PB 86-216546).

KINYOUN, J. J. A Note Uhlenhuths Method for Sputum Examination, for Tubercle Bacilli. **Am J Public Health**. 4, Dec, p.867-870. 1914.

LANGE, C., MORI, T. Advances in the Diagnosis of Tuberculosis. **Respirology**, v.15, n.2, Feb, p.220-240. 2010.

LAWN, S. D., ZUMLA, A. Tuberculosis. **Lancet**, v.378, n.9785, Jul, p.57-72. 2011.

LAWN, S. D., MWABA, P., BATES, M., PIATEK, A., ALEXANDER, H., MARAIS, B. J., CUEVAS, L. E., McHUGH, T. D., ZIJENAH, L., KAPATA, N., ABUBAKAR, I., McNERNEY, R., HOELSCER, M., MEMISH, Z. A., MIGLIORI, G. B., KIM, P., MAEURER, M., SCHITO, M., ZUMLA, A. Advances in Tuberculosis Diagnostics: The XPERT MTB/RIF Assay and Future Prospects for a Point-of-Care Test. **Lancet**, v.13, Apr, p.349-361. 2013.

MARAIS, B. J., BRITTLE, W., PAINCZYK, K., HESSELING, A. C., BEYERS, N., WASSERMAN, E., VAN SOOLINGEN, D., WARREN, R. M. Use of Light-Emitting Diode Fluorescence Microscopy to Detect Acid-Fast Bacilli in Sputum. **Clin Infect Dis**, v.15;47, n.2, Jul, p.203-207. 2008.

MARTINEZ, V., CASTILLA-LIEVRE, M. A., GUILLET-CARUBA, C., GRENIER, G., FLOR, R., DESARNAUD, S., DOUCET-POPULAIRE, F., BOUÉ, F. (18)F-FDG

PET/CT in Tuberculosis: An Early Non-Invasive Marker of Therapeutic Response. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.16, n.9, Sep, p.1180-1185. 2012.

MINION, J., LEUNG, E., MENZIES, D., PAI, M. Microscopic-Observation Drug Susceptibility and Thin Layer Agar Assays for the Detection of Drug Resistant Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Lancet Infect Dis**, v.10, n.10, p.688-698. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1ª ed. Brasília, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb_3_9_10.pdf>. Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. 1ª ed. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf>. Acesso em: 09 de abril de 2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**, v.43, Mar. 2012. Disponível em <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337634001_Tuberculose-Boletim%20Epidemio.pdf>

MORAIS, C. G. V. Padronização e Avaliação da Acurácia do Exame de Baciloscopia em Membrana de Policarbonato após Concentração pelo sistema BacFil para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2009.

MORGAN M., KALANTRI S., FLORES L., PAI M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infect Dis**, v.5, n.62, Jul, p.1-9. 2005.

NORBIS, L., MIOTTO, P., ALAGNA, R., CIRILLO, D. M. Tuberculosis: lights and shadows in the current diagnostic landscape. **New Microbiol**, v.36, n.2, Apr, p.111-120. 2013.

OKUTAN, O., KARTALOGLU, Z., KILIC, E., BOZKANAT, E., ILVAN, A. Diagnostic Contribution of Gastric and Bronchial Lavage Examinations on Cases Suggestive of Pulmonary Tuberculosis. **Yonsei Med J**, v.44, n.2, Apr, p.242-248. 2003.

ONOZAKI, I., RAVIGLIONE, M. Stopping Tuberculosis in 21st Century: Goals and Strategies. **Respirology**, v.15, n.1, Jan, p.32-43.

PALOMINO, J. C. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**, v.12, n.3, May, p.172-178. 2006.

PERES, R. L., PALACI, M., LOUREIRO, R. B., DIETZE, R., JOHNSON, J. L. MACIEL, E. L. Reduction of Contamination of Mycobacterial Growth Indicator Tubes Using Increased PANTA Concentration. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.15, n.2, Feb, p.281-283. 2011.

RIZVI, N., RAO, N. A., HUSSAIN, M. Yield of Gastric Lavage and Bronchial Wash in Pulmonary Tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.4, n.2, Feb, p.147-151. 2000.

RODRIGUES, C., VADWAI, V. Tuberculosis: Laboratory Diagnosis. **Clin Lab Med**, v.32, n.2, Jun, p.111-127. 2012.

SACEANU, C. A., PFEIFFER, N. C., MCLEAN, T. Evaluation of Sputum Smears Concentrated by Cyto centrifugation for Detection of Acid-Fast Bacilli. **J Clin Microbiol**, v.31, n.9, Sep, p.2371-2374. 1993.

SELVAKUMAR, N., RAHMAN, F., GARG, R., RAJASEKARAN, S., MOHAN, N. S., THYAGARAJAN, K., SUNDARAM, V., SANTHA, T., FRIEDEN, T. R., NARAYANAN, P. R. Evaluation of the Phenol Ammonium Sulfate Sedimentation Smear

Microscopy Method for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v.40, n.8, Aug, p.3017-3020. 2002.

SHAPIRO, H. M., HÄNSCHEID, T. Fuchsin Fluorescence in *Mycobacterium tuberculosis*: The Ziehl-Neelsen Stain in a New Light. **J Microbiol Meth**, v.74, p.119-120. 2008.

SHINGADIA, D. The Diagnosis of Tuberculosis. **Pediatr Infect Dis J**, v.31, n.3, Mar, p.302-305. 2012.

SMITHWICK, R. W., STRATIGOS, C. B. Acid-Fast Microscopy on Polycarbonate Membrane Filter Sputum Sediments. **J Clin Microbiol**, v.13, n.6, Jun, p.1109-1113. 1981.

STEINGART, K. R., HENRY, M., NG, V., HOPEWELL, P. C., RAMSAY, A., CUNNINGHAM, J., URBANCZIK, R., PERKINS, M., AZIZ, M. A., PAI, M. Fluorescence Versus Conventional Sputum Smear Microscopy for Tuberculosis: A Systematic Review. **Lancet Infect Dis**, v.6, n.9, Sep, p.570-581. 2006a.

STEINGART, K. R., NG, V., HENRY, M., HOPEWELL, P. C., RAMSAY, A., CUNNINGHAM, J., URBANCZIK, R., PERKINS, M. D., AZIZ, M. A., PAI, M. Sputum Processing Methods to Improve the Sensitivity of Smear Microscopy for Tuberculosis: A Systematic Review. **Lancet Infect Dis**, v.6, n.10, Oct, p.664-674. 2006.

STEINGART, K. R., SOHN, H., SCHILLER, I., KLODA, L. A., BOEHME, C. C., PAI, M., DENDUKURI, N. Xpert® MTB/RIF Assay for Pulmonary Tuberculosis and Rifampicin Resistance in Adults. **Cochrane Database Syst Rev**, v.31, n.1, Jan, 2013.

STOP TB PARTNERSHIP. **The Global Plan To Stop TB 2011 – 2015**. Geneva, 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500340_eng.pdf>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2014.

THORNTON, C. G., MACLELLAN, K. M., BRINK, T. L. JR., WOLFE, D. M., LLORIN, O. J., PASSEN, S. Processing Respiratory Specimens with C18-Carboxypropylbetaine: Development of a Sediment Resuspension Buffer that Contains Lytic Enzymes to Reduce the Contamination Rate and Lecithin to Alleviate Toxicity. **J Clin Microbiol**, v.36, n.7, Jul, p.2004-2013. 1998.

UDDIN, M. K., CHOWDHURY, M. R., AHMED, S., RAHMAN, M. T., KATHUN, R., VAN LETH, F., BANU, S. Comparison of Direct Versus Concentrated Smear Microscopy in Detection of Pulmonary Tuberculosis. **BMC Res Notes**, v.26, n.6(291), Jul. 2013.

WALLIS, R. S., KIM, P., COLE, S., HANNA, D., ANDRADE, B. B., MAEURER, M., SCHITO, M., ZUMLA, A. Tuberculosis Biomarkers Discovery: Developments, Needs and Challenges. **Lancet Infect Dis**, v.13, n.4, Apr, p.3620372. 2013.

WELLS, W. F., RATCLIFFE, H. L., GRUMB, C. On the Mechanics of Droplet Nuclei Infection; Quantitative Experimental Air-Borne Tuberculosis in Rabbits. **Am J Hyg**, v.47, n.1, Jan, p.11-28. 1948.

WOODS, G. L., PENTONY, E., BOXLEY, M. J., GATSON, A. M. Concentration of Sputum by Citocentrifugation for Preparation of Smears for Detection of Acid-Fast Bacilli does not Increase Sensitivity of the Fluorochrome Stain. **J Clin Microbiol**, v.33, n.7, Jul, p.1915-1016. 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Automated Real-time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF System**. Genebra, 2011. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501545_eng.pdf>. Acesso em: 02 de julho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fluorescent Light-Emitting Diode (LED) Microscopy for Diagnosis of Tuberculosis**. Genebra, 2013. Disponível em: <

http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501613_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 14 de abril de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2013**. Geneva, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2012**. Geneva, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Strategy and Targets for Tuberculosis Prevention, Care and Control After 2015**. Geneva, 2013. Disponível em < http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB134/B134_12-en.pdf?ua=1>. Acesso em: 29 de julho de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Use of Liquid TB Culture and Drug Susceptibility Testing (DST) in Low- and Medium-Income Settings. **Summary Report of the Expert Group Meeting on the Use of Liquid Cultura Media**. Geneva, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The STOP TB Strategy**. Geneva, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/2006/who_htm_tb_2006_368.pdf>. Acesso em: 17 de junho de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Treatment of Tuberculosis: Guidelines for National Programmes**. 4th ed. Geneva, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/tb_treatmentguidelines/en/>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2014.

YAJKO, D. M., NASSOS, P. S., SANDERS, C. A., MADEJ, J. J., HADLEY, W. K. High Predictive Value of the Acid-Fast Smear for *Mycobacterium tuberculosis*

Despite the High Prevalence of *Mycobacterium avium* complex in Respiratory Specimens. **Clin Infect Dis**, v.19, n.2, Aug, p.334-336. 1994.

YAJKO, D., WAGNER, C., TEVERE, V. J., KOCAGOZ, T., HADLEY, W. K., CHAMBERS, H. F. Quantitative Culture of *Mycobacterium tuberculosis* from Clinical Sputum Specimens and Dilution Endpoint of Its Detection by the Amplicor PCR Assay. **J Clin Microbiol**, v.33, n.7, Jul, p.1944-1947. 1995

YASSIN, M. A., CUEVAS, L. E., GEBREXABHER, H., SQUIRE, S. B. Efficacy and Safety of Short-Term Bleach Digestion of Sputum in Case-Finding for Pulmonary Tuberculosis in Ethiopia. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.7, n.7, Jul, p.678-683. 2003.

ZUMLA, A., ABUBAKAR, I., RAVIGLIONE, M., HOELSCHER, M., DITIU, L., MCHUGH, T. D., SQUIRE, S. B., COX, H., FORD, N., MCNERNEY, R., MARAIS, B., GROBUSCH, M., LAWN, S. D., MIGLIORI, G. B., MWABA, P., O'GRADY, J., PLETSCHETTE, M., RAMSAY, A., CHAKAYA, J., SCHITO, M., SWAMINATHAN, S., MEMISH, Z., MAEURER, M. e ATUN, R. Drug-resistant tuberculosis--current dilemmas, unanswered questions, challenges, and priority needs. **J Infect Dis**, v.205 Suppl 2, May 15, p.S228-240. 2012.

ZUMLA, A., MWABA, P., HUGGETT, J., KAPATA, N., CHANDA, D. e GRANGE, J. Reflections on the white plague. **Lancet Infect Dis**, v.9, n.3, Mar, p.197-202. 2009.

ZUMLA, A., RAVIGLIONE, M., HAFNER, R. e VON REYN, C. F. Tuberculosis. **N Engl J Med**, v.368, n.8, Feb 21, p.745-755. 2013.