

MICHELA DE LUCA FERRARI

*Resistência aos fármacos antimicrobacterianos em um  
hospital terciário: utilidade do “método de microdiluição  
em placa com sal de tetrazolium”*

CAMPINAS

UNICAMP

2009

MICHELA DE LUCA FERRARI

*Resistência aos fármacos antimicrobacterianos em um hospital terciário: utilidade do “método de microdiluição em placa com sal de tetrazolium”*

Dissertação apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mariângela Ribeiro Resende

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra Maria Luiza Moretti

CAMPINAS

UNICAMP

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

BIBLIOTECÁRIO: SANDRA LÚCIA PEREIRA – CRB-8ª / 6044

F412r Ferrari, Michela De Luca  
Resistência aos fármacos antimicobacterianos em um hospital terciário: utilidade do “método de microdiluição em placa com sal de tetrazolium” / Michela De Luca Ferrari. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Mariângela Ribeiro Resende, Maria Luiza Moretti  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tuberculose. 2. Teste de suscetibilidade. 3. Drogas – Resistência. I. Resende, Mariângela Ribeiro. II. Moretti, Maria Luiza. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**TÍTULO EM INGLÊS : SUSCEPTIBILITY OF *M. TUBERCULOSIS* TO FIRST-LINE**

**ANTIMYCOBACTERIAL AGENTS IN BRAZILIAN HOSPITAL: AESSING THE UTILITY OF THE  
TETRAZOLIUM (MTT) MICROPLATE ASSAY**

**KEYWORDS:** • **Tuberculosis**  
• **Drug susceptibility test**  
• **Drug resistance**

**Titulação: Mestrado em Clínica Médica**  
**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Banca examinadora:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariângela Ribeiro Resende**  
**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Plínio Trabasso**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosângela Siqueira Oliveira**

**Data da defesa: 20-08-2009**

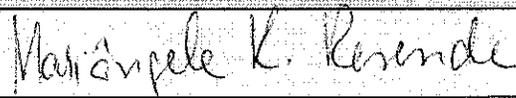
# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Michela De Luca Ferrari

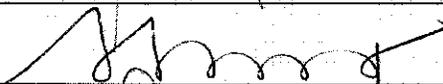
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariângela Ribeiro Resende

## Membros:

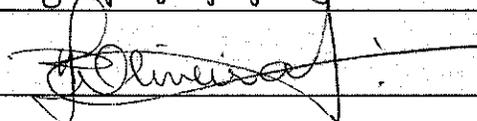
1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariângela Ribeiro Resende



2. Prof. Dr. Plínio Trabasso



3. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosângela Siqueira De Oliveira



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/08/2009

## **Dedicatória**

Aos meu querido pai Vivaldo, pelas sábias lições de coragem e ânimo e por toda a dedicação e incentivo. A minha querida mãe, companheira de todas as horas, amiga fiel, que sempre acreditou neste trabalho, sendo apoio sólido nesta jornada.

À minha irmã Melissa e minhas lindas sobrinhas Amanda e Paola que carinhosamente tornaram os momentos de fadiga em momentos de carinho e alegria.

A minha avó Lavínia pela especial atenção, carinho e essencial presença.

À Deus pai , que pela sua infinita bondade nos permitiu o desenvolvimento deste trabalho. Como uma semente plantada ao solo, plantou em nosso coração um sonho, que se transformou em ação. E a cada dia regavas o solo, com doses de coragem, amor e sabedoria. Tudo providenciastes, e a árvore cresceu florida. O que era apenas um sonho, hoje se torna realidade.

“Obrigada Senhor”

## AGRADECIMENTOS

À querida Prof<sup>a</sup> Dra Mariângela Resende pela sábia orientação, pelo incentivo e apoio, pela sábia palavra amiga em todos os momentos e em especial pela amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dra Maria Luiza Moretti, pelo incentivo e disponibilização do laboratório e por sempre acreditar e incentivar em todos os momentos em nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Plínio Trabasso pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para a dissertação.

À prof<sup>a</sup> Dra Maria Alice Telles pelos ensinamentos e pela pronta disponibilidade.

À Prof<sup>a</sup> Dra Rosângela Siqueira Oliveira pelo especial apoio, sugestões e amizade.

Aos professores do laboratório de patologia clínica da seção de microbiologia Prof. Dr. Carlos Emílio Levy, Prof<sup>a</sup> Dra Maria Cecília Barison Villares, Prof<sup>a</sup> Dra Angélica Zaninelli Schreiber pela colaboração e disponibilização do laboratório e a equipe: Prof<sup>a</sup> Dra Angela Von NowaKonski, Eliane Picolli, Cidinha, Dalva Conceição Florêncio, Dona Jandira pela atenção, amizade e pelo processamento inicial dos espécimes.

Ao Wagner Roberto de Andrade pela fiel colaboração, amizade e pelo auxílio nos momentos de dificuldade.

Aos colegas do Núcleo de vigilância epidemiológica HC-Unicamp: Eliene, Gema, Verônica Olívia, Roseli e Lizete pela paciência, cooperação e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dra Márcia Garcia pelos valiosos préstimos e sugestões.

À pós-graduanda Fernanda Simas que muito me ajudou, sempre com uma palavra experiente e amiga.

À equipe do laboratório de epidemiologia molecular e doenças transmissíveis: Márcia Maria Pedroso e Éri van pelo valioso auxílio na parte operacional e também por todo o carinho, atenção e amizade, tornando mais leves os momentos difíceis.

Aos tios Ermano e Maria Anita que muito contribuíram nesta longa jornada e pelo carinho e apoio de sempre.

As primas Aline e Giovana pela partilha, conselhos e alegria.

À prima Maurícia pelo valioso auxílio, dedicação e entusiasmo.

À minha madrinha Maria Benedita meu especial carinho e agradecimento.

A avaliação de resistência do *M. tuberculosis* aos fármacos constitui-se em prioridade, sobretudo em pacientes atendidos em hospitais de áreas metropolitanas, através de métodos eficazes e de baixo custo. Foi realizado um estudo retrospectivo entre pacientes com tuberculose confirmada por cultura positiva para o *M. tuberculosis*, atendidos no HC-UNICAMP de janeiro de 2006 a março de 2008. Os objetivos do presente estudo foram estimar a prevalência de resistência do *M. tuberculosis* aos fármacos de primeira linha entre pacientes com tuberculose diagnosticados no Hospital de Clínicas da Unicamp e avaliar o desempenho do método de microdiluição em placa com [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT) comparado ao Bactec MGIT 960®. No período foram notificados 360 casos de tuberculose. Destes 211 casos apresentaram cultura positiva para *Mycobacterium sp*, sendo incluídos 105 casos, nos quais foi identificado o *M. tuberculosis*. Dentre estes pacientes a apresentação pulmonar da TB ocorreu em 64,8% e co-infecção pelo HIV em 37,1%. A prevalência de resistência a qualquer fármaco foi de 6,7%; multidrogarresistência (RMP e INH) e resistência a INH e SM foram detectadas em 1%, em 3,8% e em 3,8% dos casos, respectivamente. Todos os isolados foram susceptíveis ao EMB. A resistência primária foi encontrada em quatro casos e resistência adquirida em três. Houve associação entre tratamento prévio e resistência ( $p=0,0181$ ), as demais variáveis estudadas não foram associadas. Dentre os 119 isolados de *M. tuberculosis* incluídos para a avaliação do desempenho do MTT, ocorreu concordância de 100% para INH e EMB entre os métodos MTT e Bactec MGIT960®, de 99% para RMP (sensibilidade: 90%), enquanto que para SM houve concordância inferior aquela apresentada pelos outros fármacos (95,2%; sensibilidade: 90,9%). A prevalência de resistência entre os casos novos atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp no período de estudo foi de 3,8% para isoniazida, 1% para rifampicina, 3,8% para etambutol e 1% multidrogarresistente. Resistência a qualquer fármaco foi observada em 6,7% dos casos. O método colorimétrico com MTT apresentou bom desempenho e representa uma alternativa acurada, simples e de reduzidos custos, viável e sustentável para locais e países com limitados recursos.

This cross-sectional, hospital-based study conducted between January 2006 and March 2008 sought to estimate the resistance of *M. tuberculosis* to first-line drugs among patients with tuberculosis confirmed by culture at a Brazilian hospital and evaluate the performance of the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT) microplate assay in comparison to the Bactec MGIT 960. During the study period were reported to the surveillance system 360 tuberculosis cases, 211 out of these were confirmed by positive culture for *Mycobacterium sp* and 105 out of these had *M. tuberculosis* isolated on culture and were included to the prevalence study. Pulmonary involvement was present in 64.8% of cases and HIV co-infection was found in 37.1%. The prevalence of *M. tuberculosis* resistance was 6.7%; multidrug-resistance [rifampin (RMP) and isoniazid (INH)] and resistance to INH and streptomycin (SM) were detected in 1%, in 3.8% and in 3.8% of cases, respectively. All isolates were susceptible to ethambutol (EMB). The resistance was primary in four cases and acquired in three cases. Previous treatment was associated with resistance ( $p=0.0181$ ). Among 119 isolates of *M. tuberculosis* included to the MMTT performance evaluation, there was 100% observed agreement for INH and EMB between the MTT and Bactec MGIT 960<sup>TM</sup> methods. For RMP, the observed agreement was 99% (sensitivity: 90%), and for SM, the level of agreement was lower (95.2%; sensibility 90.9%) than those of the other drugs. The prevalence of *M. tuberculosis* resistance among the new cases during the study period was 6.7%; multidrug-resistance and resistance to INH and streptomycin (SM) were detected in 1%, in 3.8% and in 3.8% of cases, respectively. The colorimetric method with tetrazolium (MTT) represents an accurate, simple and low cost alternative that is both viable and sustainable for settings with limited resources.

## Lista de tabelas e figuras

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Prevalência de TB-MDR entre os casos novos, com tratamento prévio e combinados de TB por região: 1994 - 2007 (Adaptado de WHO, 2008)	42
<b>Figura 2.</b> Prevalência de resistência aos fármacos específicos entre os casos novos por região: 1994 – 2007 (Adaptado WHO, 2008).....	43
<b>Figura 3.</b> Algoritmo de realização dos exames microbiológicos.....	58
<b>Tabela 1.</b> Cálculo dos parâmetros para avaliação do desempenho do teste diagnóstico.....	66
<b>Figura 4.</b> Casos notificados no período de janeiro 2006 a março de 2008 de acordo com os resultados da cultura para micobactéria.....	71
<b>Figura 5.</b> Algoritmo dos resultados da identificação pelo PNB e PRA- <i>hsp65</i> (IAL-SP).....	72
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo as características demográficas, de janeiro de 2006 a março de 2008.....	74
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo as características de apresentação clínica, de janeiro de 2006 a março de 2008.....	75
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo as características microbiológicas, de janeiro de 2006 a março de 2008.....	76

<b>Tabela 5.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo a presença de comorbidades, de janeiro de 2006 a março de 2008.....	77
<b>Tabela 6.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo o tratamento antimicobacteriano prévio, de janeiro de 2006 a março de 2008.....	78
<b>Tabela 7.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos de acordo com o perfil de susceptibilidade aos fármacos, pelos métodos MMTT e Bactec MGIT 960®.....	79
<b>Tabela 8.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose de acordo com as características demográficas, clínico epidemiológicas e de evolução segundo o perfil de susceptibilidade aos fármacos antimicobacterianos	80
<b>Tabela 9.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica por mês de tratamento.....	81
<b>Tabela 10.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no segundo mês de tratamento e a presença de resistência.....	81
<b>Tabela 11.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no sexto mês de tratamento e a presença de resistência.....	82
<b>Tabela 12.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no nono mês de tratamento e a presença de resistência.....	83
<b>Tabela 13.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no décimo segundo mês de tratamento e a presença de resistência.....	83

<b>Tabela 14.</b>	Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no décimo oitavo mês de tratamento e a presença de resistência.....	84
<b>Tabela 15.</b>	Distribuição dos 14 isolados resistentes incluídos no grupo II de acordo com a susceptibilidade aos fármacos de primeira linha, pelo Bactec MGIT 960®.....	85
<b>Tabela 16.</b>	Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II de acordo com o perfil de susceptibilidade aos fármacos, pelos métodos MTT e Bactec MGIT 960®.....	86
<b>Tabela 17.</b>	Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com o desempenho do MMTT e Bactec MGIT 960®.....	87
<b>Tabela 18.</b>	Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) para isoniazida.....	89
<b>Tabela 19.</b>	Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) para rifampicina.....	90
<b>Tabela 20.</b>	Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) para cloridrato de etambutol diluído em água (EMB-a) e etanol (EMB-e).....	91
<b>Tabela 21.</b>	Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a comparação das concentrações (CIM) para etambutol diluído em água (EMB-a) e etanol (EMB-e).....	92
<b>Tabela 22.</b>	Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) para sulfato de estreptomicina diluído em água (SM-a) e diluído em água + phenol (SM-p).....	93

<b>Tabela 23.</b>	Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a comparação das concentrações inibitória mínima (CIM) para sulfato de estreptomicina diluído em água (SM-a) e água + phenol (SM-p).....	94
<b>Tabela 24.</b>	Distribuição dos 105 casos do grupo I de acordo com a CIM da isoniazida e tipo de ingresso do caso.....	95
<b>Tabela 25.</b>	Distribuição dos 105 casos do grupo I de acordo com a CIM da rifampicina e o tipo de ingresso do caso.....	96
<b>Tabela 26.</b>	Estudos brasileiros de prevalência de resistência aos fármacos antimicobacterianos.....	101
<b>Tabela 27</b>	Estudos de prevalência de resistência aos fármacos antimicobacterianos, de base hospitalar, em países em desenvolvimento.....	101
<b>Tabela 28</b>	Estudos de desempenho e valores de sensibilidade e de especificidade dos fármacos de 1ª linha para o MMTT.....	106
<b>Tabela 29</b>	Estudos que utilizaram métodos colorimétricos para a detecção de resistência aos fármacos do <i>M.tuberculosis</i> .....	107
<b>Figura 6</b>	Comparação do tempo de obtenção dos resultados para o método das proporções, Bactec MGIT 960® e MMTT.....	109

## *Lista de Siglas e Abreviaturas*

---

aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
bp	Pares de base
<i>Bst</i> II	Endonuclease de restrição <i>Bst</i> II
CIM	Concentração inibitória mínima
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DRS XII	Direção Regional de Saúde XII
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxi nucleotídeos tri-fosfato
EMB	Etambutol
EMB-a	Etambutol diluído em água
EMB-e	Etambutol diluído em água + etanol
<i>embB</i>	Gene <i>embB</i>
FAEP	Fundo de apoio ao ensino e pesquisa da Universidade Estadual de Campinas
H37Rv	Cepa de referência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Hae III	Enzima de restrição isolada de <i>Haemophilus aegyptius</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HC-Unicamp	Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IAL	Instituto Adolfo Lutz
<i>inhA</i>	Gene que codifica enzima <i>enoyl</i> -ACP redutase
INH	Isoniazida
IS6110	Sequência de inserção 6110

KCl	Cloreto de potássio
<i>katG</i>	Gene que codifica a enzima catalase-peroxidase
<i>KatG 315</i>	Códon 315 do gene <i>KatG</i>
LJ	Löwenstein Jensen
MDR	Multidrogarresistência
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MNT	Micobactérias não pertencentes ao CMTB
Mods	“Microscopic observation drug susceptibility”- Observação microscópica da sensibilidade aos fármacos
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide]
MMTT	Método de microdiluição em placa com MTT
NaCl	Cloreto de sódio
NCCLS	“National Committe for Clinical Laboratory Standards”
NRA	“Nitrate reductase assay” – Ensaio com nitrato redutase
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrose, catalase
OMS	Organização mundial de saúde
PNB	Ácido p- nitrobenzóico
PRA- <i>hsp65</i>	“PCR-restriction enzyme analysis”- Análise do padrão de restrição por reação em cadeia da polimerase
PZA	Pirazinamida
REMA	Método de microdiluição em placa com resazurina
RMP	Rifampicina
<i>rpoB</i>	Gene que codifica a RNA polimerase
<i>rpsL</i>	Gene que codifica a proteína ribossomal S12
<i>rrs</i>	Gene codificador do RNA 16S
RZ	Resazurina
Rx	Radiografia

SM	Estreptomicina
SM-a	Estreptomicina diluída em água
SM-p	Estreptomicina diluída em água e phenol
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multidrogarresistente
TE	tris/HCl/EDTA
TS	Teste de susceptibilidade aos fármacos
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente
WHO	“World Health Organization” – Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>Resumo.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Tabelas e figuras.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de Siglas e abreviaturas.....</b>	<b>xxv</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>39</b>
1.1. Epidemiologia da tuberculose no mundo.....	41
1.2. Epidemiologia da tuberculose no Brasil.....	43
1.3. Resistência do <i>M. tuberculosis</i> aos fármacos antimicobacterianos.....	45
1.4. Diagnóstico laboratorial de resistência – testes de susceptibilidade aos fármacos.....	46
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>49</b>
<b>3. Casuística e Métodos.....</b>	<b>53</b>
3.1. Período de estudo.....	55
3.2. Desenho do estudo.....	55
3.3. Caracterização do local de estudo.....	55
3.4. População de estudo e seleção da casuística.....	55
3.4.1. Seleção dos casos.....	55
3.4.2. Critérios de inclusão.....	56
3.4.3. Critérios de exclusão.....	57

3.5. Avaliação dos casos.....	57
3.5.1. Métodos laboratoriais microbiológicos.....	57
3.5.1.1. Método de identificação através da inibição seletiva com ácido p-nitrobenzóico (PNB).....	59
3.5.1.2. Método colorimétrico com o sal de Tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide].....	59
3.5.1.3. Controle de Qualidade dos reagentes e pureza das culturas...	62
3.5.1.4. Bactec MGIT 960®.....	63
3.5.2. Dados clínicos – epidemiológicos.....	64
3.6. Análise dos resultados.....	65
3.6.1. Avaliação da prevalência.....	65
3.6.2. Avaliação do desempenho do teste colorimétrico em microplaca com sal de tetrazolium.....	66
3.6.3. Avaliação da situação clínica.....	67
3.6.4. Análise estatística.....	67
3.7. Aspectos éticos da pesquisa.....	67
3.8. Suporte Financeiro.....	68
<b>4. Resultados.....</b>	<b>69</b>
4.1. População de estudo.....	71
4.2. Resultados do estudo de prevalência.....	73

4.2.1. Caracterização demográfica e clínica.....	73
4.2.2. Prevalência de resistência aos fármacos antimicobacterianos.....	78
4.2.3. Desfecho clínico dos casos avaliados no estudo de prevalência.....	80
4.3. Utilidade do método colorimétrico de microdiluição em placa com sal de tretrazolium na avaliação de resistência do <i>M. tuberculosis</i> comparado ao Bactec MGIT 960®.....	84
4.3.1 Desempenho do MMTT.....	84
4.3.2. Concentração inibitória mínima dos isolados frente aos fármacos.....	87
<b>5. Discussão.....</b>	<b>97</b>
5.1. Prevalência de resistência aos fármacos de primeira linha.....	99
5.2. Fatores relacionados à resistência.....	102
5.3. Desfecho dos casos de acordo com perfil de susceptibilidade aos fármacos antimicobacterianos.....	102
5.4. Utilidade do PNB na triagem para a identificação da espécie.....	104
5.5. Utilidade do teste colorimétrico de microdiluição em placa com sal de tetrazolium para avaliação de susceptibilidade do <i>M.tuberculosis</i> .....	105
5.5.1. Desempenho do MMTT.....	105
5.5.2. Comparação dos métodos.....	108
5.5.3. Estabilidade dos fármacos para testes de susceptibilidade.....	110
5.5.4. Concentração inibitória mínima dos diferentes fármacos e padronização dos pontos de corte.....	112

<b>6. Conclusão.....</b>	<b>115</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>119</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>133</b>
Anexo 1. Métodos microbiológicos utilizados.....	135
Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	138
Anexo3. Ficha de notificação de tuberculose do sistema nacional de agravos de notificação.....	140
Anexo 4. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.....	142
Anexo 5. Relação das cidades pertencentes à DRS XII.....	145
Anexo 6. Manuscrito submetido ao periódico Brazilian journal of medical and biological research.....	146

# ***1. INTRODUÇÃO***

## 1.1. Epidemiologia da tuberculose no mundo

A resistência aos fármacos antimicobacterianos é um fenômeno ubíquo e emergente, resultante de regimes terapêuticos anárquicos, sendo um útil indicador do desempenho do programa de controle da doença. Resistência à isoniazida (INH) e à rifampicina (RMP) (tuberculose multidrogarresistente – TB-MDR) têm sido descritas nos diversos continentes, com implicação direta no curso clínico da doença, no resultado do tratamento, na letalidade relacionada à doença (50-80%) e nos custos relacionados ao manejo da tuberculose (TB) (1).

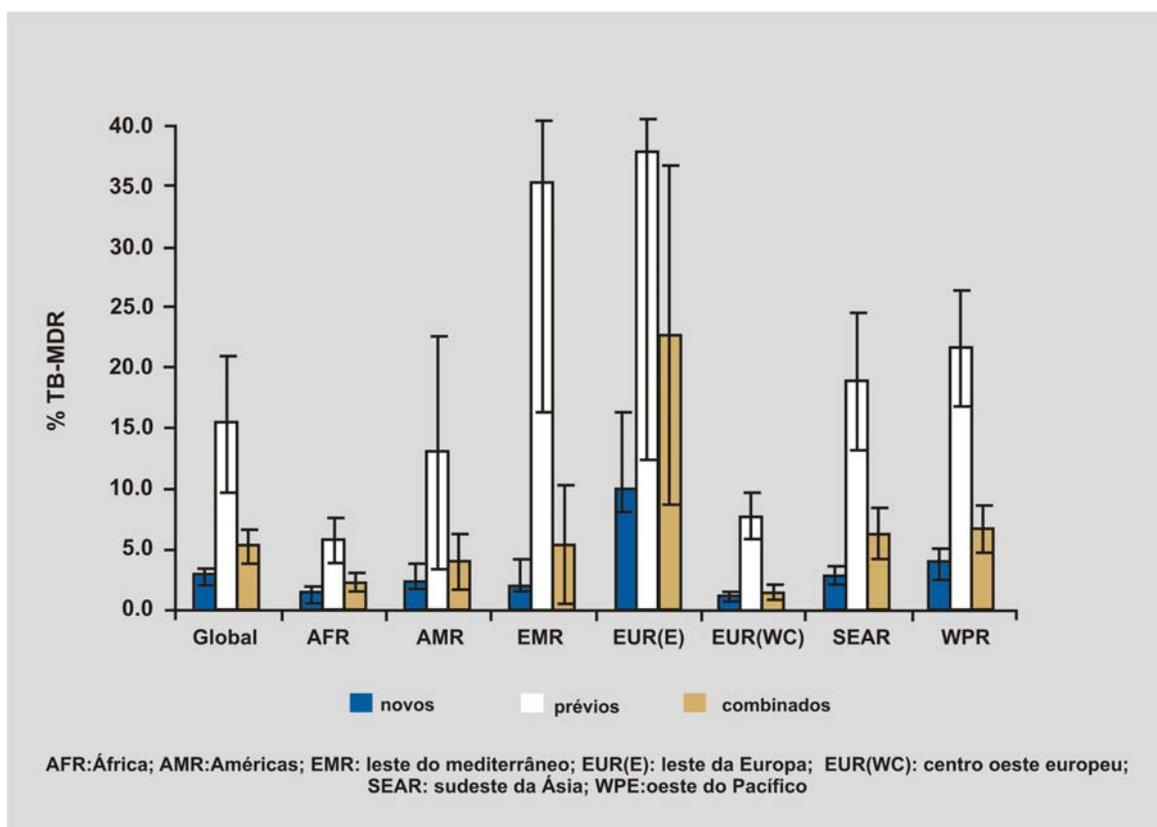
A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram cerca de nove milhões de casos novos de tuberculose ativa por ano e que cerca de dois milhões evoluam para óbito no mundo. Em números absolutos a maior parte dos casos é registrada na Índia e China, entretanto na avaliação por coeficiente de incidência o continente africano apresenta o maior coeficiente, de 363/100.000 habitantes, sendo que na África do Sul atinge 948/100.000 habitantes (2).

Em 2007, dentre todos os episódios de TB (casos novos e retratamento), a ocorrência de TB-MDR foi estimada em 4,9% (510.000 casos). Destes, 289.000 eram casos novos e 221.000 foram previamente tratados (Figura 1). Alguns países, como os da antiga União Soviética, Índia e a China concentram as maiores prevalências de resistência (Figura 2). Entre os países das Américas foi encontrada maior prevalência de multidrogarresistência entre os casos novos na Guatemala (3%), Peru (5,3%) e República Dominicana (6,6%) (2).

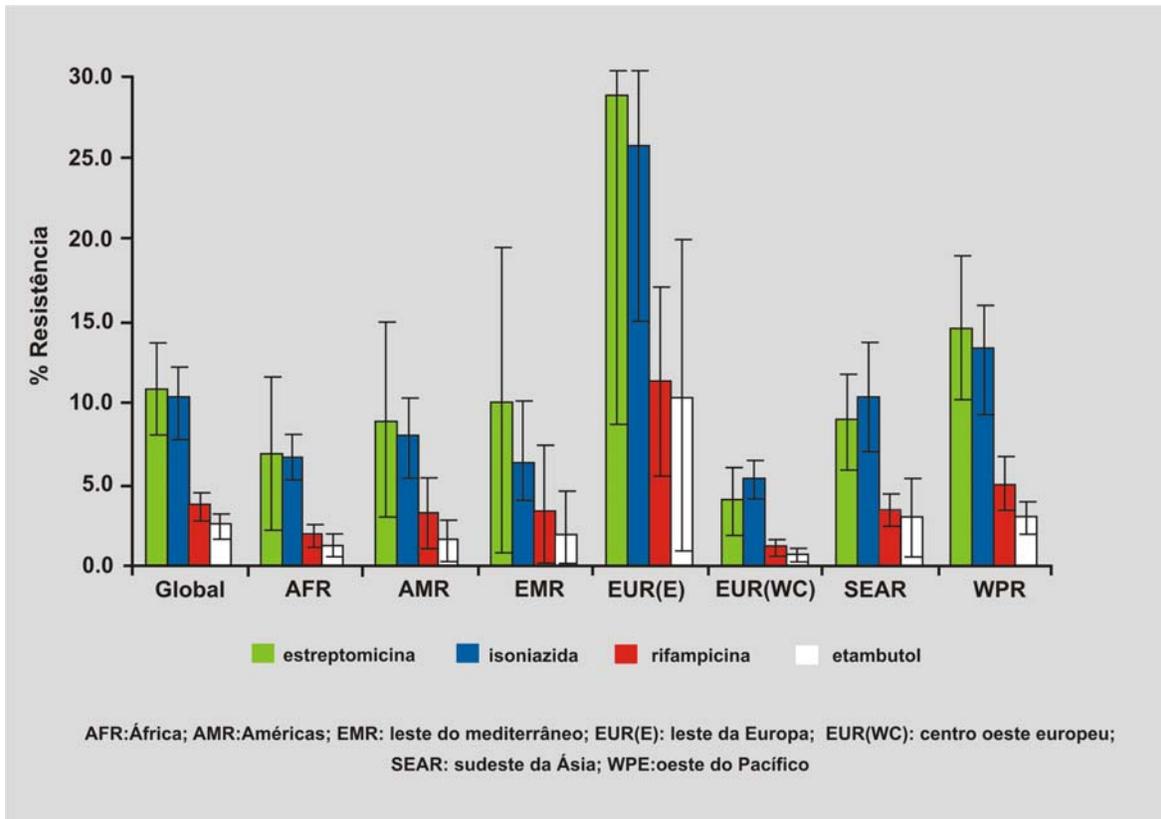
Em 2008, é provável que apenas 2% dos casos multirresistentes no mundo tenham sido diagnosticados e tratados corretamente, fato associado aos problemas de acesso ao diagnóstico laboratorial, sobretudo aos testes de susceptibilidade aos fármacos (3).

O espectro da multidrogarresistência tem ampliado, com ocorrência de casos confirmados de tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB), no período de 2002 a

2006, em mais de 45 países de todas as regiões do mundo. São considerados extensivamente resistentes os casos que apresentam resistência à RMP, INH, além de qualquer fluorquinolona e a pelo menos um dos três fármacos de segunda linha injetáveis: amicacina, kanamicina ou capreomicina (4). Estima-se 40.000 casos emergentes de XDR-TB por ano representando uma ameaça à saúde pública global, especialmente em países com elevada prevalência de aids (5).



**Figura 1- Prevalência de TB-MDR entre casos novos, tratamento prévio combinados de TB por região: 1994- 2007. Adaptado de OMS, 2008**



**Figura 2. Prevalência de resistência aos fármacos entre os casos novos por região: 1994 – 2007. Adaptado de OMS, 2008.**

## 1.2. Epidemiologia da tuberculose no Brasil

O Brasil ocupa o 14º lugar, dentre os 22 países com ocorrência de 80% dos casos de TB do mundo. Em 2007, segundo a OMS, a estimativa é de que tenham ocorrido 92.102 casos novos de tuberculose, entretanto foram notificados apenas 74.757 casos

novos, destes 78% apresentaram cultura positiva. O coeficiente de incidência para aquele ano foi de 48/100.000 habitantes (2).

Os coeficientes de incidência são heterogêneos ao longo do país. No Estado de São Paulo, houve uma redução expressiva do coeficiente de incidência da tuberculose de 48,1 para 35,9 por 100.000 habitantes, em 2000 e 2007, respectivamente (6). Além do número expressivo de casos a TB continua sendo causa de óbito no país, com coeficiente de mortalidade de 3,0/100.000 habitantes entre os casos não infectados pelo HIV e 1,0/100.000 habitantes entre os infectados, em 2007 (2).

A magnitude da TB-MDR, em níveis nacionais, começou a ser avaliada de forma mais sistemática a partir do projeto global de vigilância de resistência realizado pela OMS, com dados relativos ao período de 1994 a 1997. Nesta avaliação foi observada resistência primária à isoniazida em 5,9%, enquanto que MDR em 0,9% dos casos avaliados (1). Em 2007, dados da OMS evidenciaram a ocorrência de TB-MDR primária em 0,9% (275 casos) e adquirida de 5,4% (557) (2). Foi observado entretanto, no II inquérito nacional de resistência aos fármacos anti-TB conduzido em 2007-2008 elevação da resistência primária isolada à INH ( de 4,4 % para 6%) e da MDR primária ( de 0,9% para 1,4%)(7).

Inquérito para avaliação de resistência aos fármacos antimicobacterianos, no Estado de São Paulo, evidenciou multidrogaresistência global de 2,4%, 3,9% e 3,1% no interior, no litoral e na grande São Paulo, respectivamente (8). No município de São Paulo, estudo de base populacional realizado numa região da cidade evidenciou TB-MDR primária e secundária em 1% e 16,7%, respectivamente, em 2005 (9). Os dados regionalizados do II inquérito nacional de resistência não foram divulgados até setembro de 2009.

O município de Campinas é considerado prioritário no estado de São Paulo nas ações de controle da tuberculose (TB), baseado no coeficiente de incidência da doença, na evolução do tratamento e na prevalência de coinfeção pelo HIV. De 2000 a 2004, o coeficiente de incidência da tuberculose em Campinas, variou de 49,2 em 2000 a

33,1/100.000 habitantes, entretanto os dados populacionais relativos à resistência são escassos na região (10).

### **1.3. Resistência do *M. tuberculosis* aos fármacos antimicrobianos**

Do ponto de vista clínico-epidemiológico a resistência aos fármacos é dividida em dois tipos: primária e adquirida. Considera-se resistência adquirida aquela presente em situações em que o paciente já foi submetido, anteriormente, a tratamento específico para TB por pelo menos um mês (1). Dentre os fatores relacionados à TB-MDR têm sido descritos: irregularidade e/ou abandono de tratamento, apresentação clínica pulmonar com elevada carga bacilar, coinfeção pelo HIV, *diabetes mellitus*, etilismo, ser profissional da área de saúde e ter antecedente de institucionalização (11).

A história e a duração de tratamento prévio foram identificadas como fatores de risco para TB-MDR no estudo de vigilância global de resistência aos fármacos realizado pela OMS, enquanto que neste mesmo estudo não houve associação à infecção pelo HIV (1).

A infecção pelo HIV aumenta a taxa de adoecimento do paciente infectado pelo *M.tuberculosis* ao longo da vida e pode amplificar e acelerar surtos hospitalares ou comunitários de TB-MDR à medida que o risco de progressão para doença é elevado e o intervalo entre a infecção e o início da doença é reduzido significativamente (12). Associa-se ao HIV, a história de admissão hospitalar prévia, uso de drogas endovenosas e institucionalização (albergues, presídios) (13).

Estudos nacionais de transmissão da TB, baseados em métodos moleculares, têm evidenciado a relação entre agrupamento genotípico e MDR. A ocorrência de agrupamentos genotípicos entre cepas de pacientes com tuberculose e infecção pelo HIV

foi evidenciada em estudo de base hospitalar em Campinas, com possível vínculo de transmissão intra-hospitalar da doença. (14).

O cenário da multirresistência em hospitais têm sido avaliado em diversos estudos internacionais através da demonstração de surtos relacionados à multirresistência e à infecção pelo HIV. Na década de 90 diversos estudos evidenciaram associação de surtos de TB-MDR e infecção pelo HIV (15, 16, 17,18). No Brasil, poucos estudos têm avaliado a prevalência de multidrogarresistência em pacientes atendidos em hospitais.

Em situações de rotina, os testes de susceptibilidade são realizados com critérios previamente definidos, como retratamentos, falência terapêutica, coinfeção pelo HIV e populações que apresentam maior risco de resistência (institucionalizados, profissionais da área de saúde, pacientes sem moradia fixa) (19). Estes critérios superestimam, não permitindo concluir sobre a real magnitude do problema.

#### **1.4. Diagnóstico laboratorial de resistência: testes de susceptibilidade aos fármacos.**

O mecanismo de resistência do *M.tuberculosis* aos antimicobacterianos é primariamente atribuído a presença de mutações em genes alvos dos fármacos (cromossômica), sendo a probabilidade de seleção de mutantes resistentes diretamente relacionadas à população bacilar. A probabilidade de desenvolvimento de resistência é diferenciada entre os fármacos e não confere uma vantagem seletiva, exceto nas situações de exposição aos fármacos, nas quais ocorrerá a seleção populacional (1). As mutações em genes alvos dos fármacos têm sido elucidadas de tal forma que é possível prever aproximadamente 90% da resistência à RMP, SM, e EMB e 75% da resistência à INH, pela triagem de seis códons específicos: *rpoB531*, *rpoB526*, *rrs513*, *rpsL43*, *embB306*, e *katG315*, *inhA* (20,21,22,23,24,25). Embora tenham sido desenvolvidos diversos métodos genotípicos para a avaliação de resistência, ainda não há como prescindir os testes fenotípicos.

O diagnóstico microbiológico da TB resistente aos fármacos pelos métodos fenotípicos convencionais é laborioso e demanda várias semanas para a sua execução, entretanto o intervalo para o conhecimento do padrão de susceptibilidade pode ser crítico na condução individual do paciente (26).

O método de referência é o das proporções, no qual concentrações críticas dos fármacos são colocadas no meio sólido e o número de colônias de *M. tuberculosis* é comparado ao meio sem o fármaco, se a proporção for igual ou superior à proporção crítica para cada fármaco, o isolado é considerado resistente. O tempo médio para a obtenção do resultado é de quatro a seis semanas (27).

A disponibilidade de sistemas semi-automatizados (radiométrico Bactec460®) (Becton Dickson Inst Systems, Sparks, MD) e automatizados [MB Bact® (Organon Teknika), ESP II® (Difco laboratories-Trek diagnostic Systems), Bactec MGIT 960® (Becton Dickson Inst Systems, Sparks, MD)] de detecção de resistência permitiram abreviar o tempo para o conhecimento do padrão de susceptibilidade para 21 dias a partir da coleta do espécime. Contudo, o sistema radiométrico, devido à dificuldade de descarte do material radioativo e aos custos envolvidos, vem sendo substituído nos últimos anos por sistemas não radiométricos: MGIT 960®, MB Bact e ESP II (28).

O Bactec MGIT 960® se caracteriza por ser um sistema totalmente automatizado que apresenta equipamentos de monitoramento contínuo, e já se encontra validado internacionalmente e aprovado pela Anvisa para a realização de testes de susceptibilidade aos fármacos (TS) de primeira linha. O custo dos exames através do Bactec MGIT960® é o grande limitante para a sua utilização em países em desenvolvimento, além da necessidade de equipamentos especiais o que limita a sua utilização em locais com pouca infra-estrutura e recursos limitados (28).

Os métodos genotípicos disponíveis para avaliação de susceptibilidade aos fármacos apresentam como principal vantagem a agilidade diagnóstica, sendo possível sua realização diretamente do espécime clínico. Estes testes utilizam o prévio conhecimento

dos mecanismos mais prevalentes de resistência aos fármacos de primeira linha e permitem o diagnóstico em geral através de autossequenciamento de produtos de PCR (29). Apesar das vantagens, os métodos genotípicos não dispensam os fenotípicos, visto que pode ocorrer o compartilhamento de genes de resistência, assim como a presença de novas mutações ou genes silenciosos. Além disso, a ocorrência de populações micobacterianas heterogêneas tem sido descritas (30). De destaque é necessário ressaltar ainda o elevado custo, tornando-os proibitivos em situações de rotina, em países com intermediária ou elevada prevalência de tuberculose (29).

Com vistas a equacionar a questão do custo, associada à maior agilidade no diagnóstico da resistência, têm sido propostos testes fenotípicos de susceptibilidade aos fármacos antimicobacterianos, utilizando indicadores de oxiredução (Alamar Blue®, rezasurina ou tetrazolium) como uma alternativa mais rápida que outros testes fenotípicos convencionais e com custos inferiores às técnicas automatizadas (Bactec MGIT 960®). Os sais de rezasurina ou tetrazolium funcionam como substratos cromogênicos de desidrogenases e permitem avaliar a viabilidade celular na presença de diferentes concentrações do fármaco alvo (29, 30, 31).

A OMS recomenda estudos para o desenvolvimento de TS, particularmente para *M.tuberculosis*, devido ao fato destes testes apresentarem dificuldades para a padronização (1), além do fato de não terem sido amplamente implementados nos locais com recursos limitados, pelo ao nível de sofisticação e pelos custos envolvidos (32).

O método de microdiluição em placa com sais de resazurina e tetrazolium (MTT) têm sido testado com sucesso e os resultados relataram similaridade, não apresentando diferenças significativas entre os sais tanto para os pontos de corte quanto para a eficácia (31,33).

A avaliação do desempenho das técnicas colorimétricas em laboratórios de rotina pode contribuir para a padronização e utilização das mesmas em laboratórios de menor complexidade, favorecendo a identificação mais rápida e tratamento adequado do paciente com tuberculose resistente aos fármacos, em países em desenvolvimento.

## **2.OBJETIVOS**

- Estimar a prevalência de resistência aos fármacos de primeira linha, isoniazida, rifampicina, etambutol e estreptomicina entre os casos novos de tuberculose atendidos no Hospital De Clínicas da Unicamp.
- Avaliar a sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do teste colorimétrico de microdiluição em placa com sal de tetrazolium na determinação da resistência do *M. tuberculosis* aos fármacos de primeira linha.
- Avaliar o desfecho dos casos de acordo com o perfil de susceptibilidade aos fármacos antimicobacterianos.

### **3.CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---

### **3.1. PERÍODO DE ESTUDO**

De janeiro de 2006 a março de 2008

### **3.2. DESENHO DO ESTUDO**

Coorte retrospectivo

### **3.3. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO**

O estudo foi conduzido no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp), hospital universitário de 325 leitos, referência terciária para Campinas e região. De janeiro de 2006 a março de 2008 foram notificados pelo Núcleo de Vigilância Epidemiológica – Seção de Epidemiologia Hospitalar do HC-Unicamp, 360 casos de TB. O HC-Unicamp conta com laboratório de patologia clínica/Setor de microbiologia/micobactéria do departamento de Patologia clínica para o diagnóstico de infecções micobacterianas, nível II e durante o período do estudo realizou na rotina, pesquisa de BAAR (bacilo álcool ácido resistente) e cultura através do método de detecção MB-Bact®.

### **3.4. POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA CASUÍSTICA**

#### **3.4.1. Seleção dos casos**

A seleção dos casos foi realizada pela comparação dos resultados das culturas para *M. tuberculosis* do laboratório de Microbiologia com o banco de notificações

do Núcleo de Vigilância Epidemiológica do HC-Unicamp. Foram definidos dois grupos de estudo:

- Grupo I - para o estudo de prevalência foram selecionados todos os casos novos com cultura positiva para *Mycobacterium sp*, no período de janeiro de 2006 a março de 2008. Após a seleção dos casos foi realizada a revisão de prontuário e os métodos laboratoriais.
- Grupo II – para a avaliação de desempenho do MTT foram selecionados além dos casos acima, casos com resistência previamente conhecida não pertencentes ao período de inclusão e cujas cepas se encontravam viáveis.

### **3.4.2. Critérios de inclusão**

Para o grupo I foram incluídos pacientes:

- com idade superior a 14 anos
- com TB confirmada por meio de cultura positiva para o complexo *M. tuberculosis*, independente do espécime clínico, infectados ou não pelo HIV, internados e ou atendidos em qualquer unidade do HC-Unicamp.

Para pacientes com notificações múltiplas, foi incluído apenas o primeiro episódio com cultura positiva durante o período avaliado.

Para o grupo II foram incluídos pacientes:

- incluídos no grupo I e
- casos com TB confirmada por meio de cultura positiva para o complexo *M. tuberculosis* e que apresentaram resistência a qualquer fármaco de primeira linha confirmados pelo teste de susceptibilidade, fora do período de inclusão (janeiro de 2006 a março de 2008).

- cujas cepas apresentaram crescimento no meio de cultura e não continham contaminação por outros microrganismos.

### **3.4.3. Critérios de exclusão**

Foram excluídos do grupo I casos:

- em que a identificação não confirmou a espécie como *M.tuberculosis*
- nos quais não ocorreu o crescimento adequado nos meios de cultura ou ocorreu contaminação após o subcultivo;
- cujos dados clínico-epidemiológicos não estiveram disponíveis para a análise;
- com isolados de *M. tuberculosis* repetidos de um mesmo paciente

Foram excluídos do grupo II casos:

- nos quais não ocorreu o crescimento adequado nos meios de cultura ou ocorreu contaminação após o subcultivo;
- com isolados de *M. tuberculosis* repetidos de um mesmo paciente.

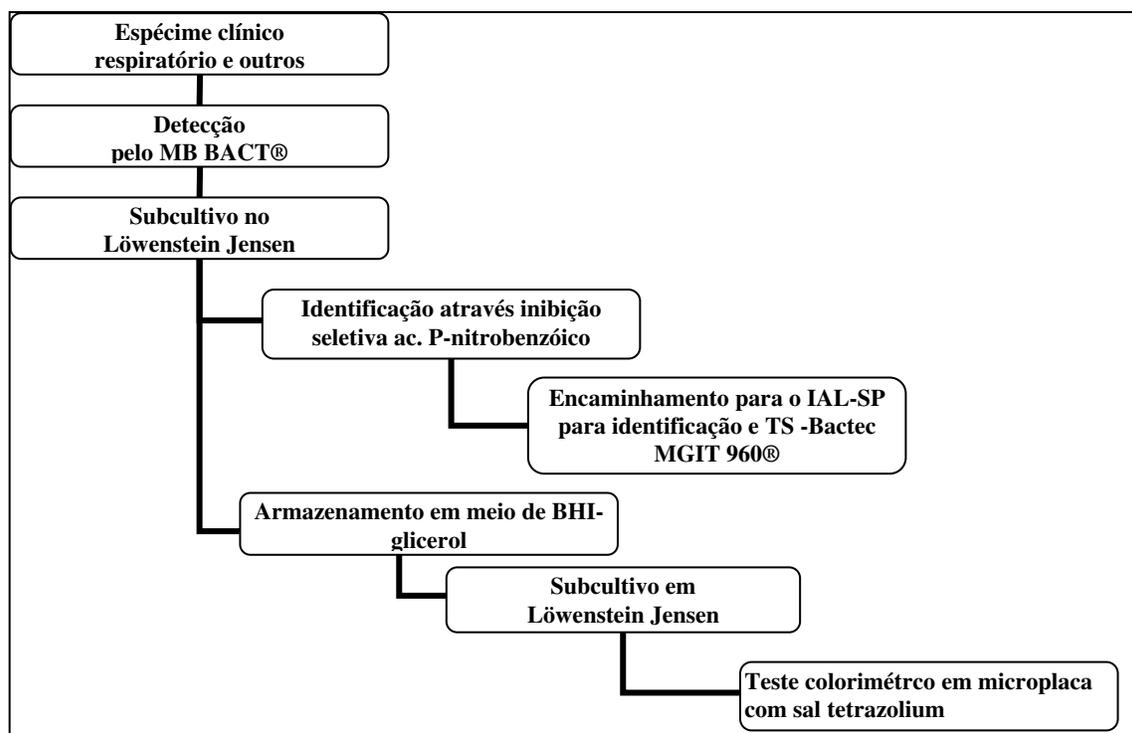
## **3.5. AVALIAÇÃO DOS CASOS**

### **3.5.1. Métodos laboratoriais microbiológicos**

A seleção, inclusão e exclusão dos casos foi realizada conforme definido nos itens 3.4.1, 3.4.2 e 3.4.3. Após a identificação dos pacientes elegíveis para o estudo foram realizados os TS. Os exames microbiológicos (pesquisa de BAAR e cultura foram realizados na rotina do Laboratório de Patologia Clínica do HC-Unicamp/Setor de

Microbiologia/Micobactérias/Departamento de Patologia Clínica. Os métodos utilizados para pesquisa de BAAR nos diversos espécimes e de cultura pelo sistema MB Bact® são descritos no Anexo 1. Após a seleção dos isolados foram realizadas as seguintes etapas:

- semeadura e crescimento em Löwenstein Jensen;
- identificação pelo método de inibição seletiva através do ácido p-nitrobenzóico (PNB) pela própria pesquisadora;
- realização em paralelo pelo Instituto Adolfo Lutz da confirmação da identificação pelo método de PRA-*hsp65*, dos isolados de *M. tuberculosis* (Anexo 1);
- realização do Teste de sensibilidade aos fármacos pelo Bactec MGIT 960® (BECTON DICKINSON) pelo Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz.
- realização do teste colorimétrico de microdiluição em placa com sal de tetrazolium pela própria pesquisadora (Figura 3);



**Figura 3. Algoritmo de realização dos exames microbiológicos**

### **3.5.1.1. Método de identificação através da inibição seletiva com ácido p-nitrobenzóico**

O método baseia-se na capacidade do ácido p-nitrobenzóico na concentração de 500µg/mL em inibir o crescimento das espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

A solução estoque do ácido p-nitrobenzóico (PNB) na concentração de 25mg/mL foi adicionada em uma proporção de 4 mL para 200ml do meio LJ antes da coagulação. A concentração final no meio LJ foi de 500µg/mL.

Para o preparo da suspensão micobacteriana foi retirada uma porção do microrganismo a partir da cultura em Löwenstein Jensen e adicionada em um tubo contendo 2 ml de água destilada estéril e pérolas de vidro para auxiliar a quebra dos grumos. O tubo foi então agitado em vórtex, e em seguida permaneceu em repouso por 15 minutos. Retirou-se 1 mL do sobrenadante e transferiu-se para outro tubo a fim de ajustar a turbidez de acordo com o tubo N°1 da escala Mc Farland. Uma alíquota de 500µl da suspensão foi então adicionada ao meio de cultura LJ contendo PNB, sendo incubado a 37°C por 12 dias (37).

Após esse período foi avaliado o crescimento, se ausente o isolado foi identificado como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* e encaminhado para a confirmação pelo IAL e demais etapas subsequentes.

### **3.5.1.2. Método colorimétrico com sal de Tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide] MTT (MMTT) .**

O método foi realizado de acordo com o descrito por Franzblau *et al* com modificações (31). Os fármacos utilizados para o método foram: isoniazida (INH) (Sigma Aldrich), rifampicina (RMP) (Sigma Aldrich), cloridrato de etambutol (EMB) (Sigma

Aldrich) e sulfato de estreptomicina (SM) (Sigma Aldrich). Soluções estoque para os fármacos testados foram preparadas em água destilada estéril para isoniazida, etambutol e estreptomicina e metanol para rifampicina, na concentração de 1% para todos os fármacos e a seguir foram congeladas a -20°C por até três meses. Na tentativa de se preservar as características químicas e farmacológicas dos fármacos, para etambutol uma segunda solução estoque contendo 20% de etanol e água como veículo foi preparada, e para estreptomicina, 5ul de uma solução de phenol a 5% foi adicionada a 995ul de uma solução composta por 1% do fármaco e água. Foi utilizado para o método o meio Middlebrook 7H9 Broth contendo glicerol e enriquecido com OADC (BECTON DICKINSON) (composto por ácido oléico, albumina, dextrose e catalase) a 10%.

As soluções de trabalho para cada fármaco foram preparadas da seguinte forma: a partir da solução estoque, utilizou-se o meio 7H9 enriquecido, para preparar uma solução de trabalho com concentração quatro vezes maior que a concentração esperada (primeira concentração da diluição seriada).

As concentrações escolhidas para o teste na microplaca de todos os fármacos foram: 16 µg/mL a 0,015 µg/mL para INH; 32 µg/mL a 0,003 µg/mL RMP; 16 µg/mL a 0,030 µg/mL para EMB e 16 µg/mL a 0,010 µg/mL para SM .

A partir do crescimento recente de até 30 dias do *M. tuberculosis* em meio sólido Löwenstein Jensen, foram preparados subcultivos em tubos contendo 2 mL do meio de cultura Middlebrook 7H9 e incubados por sete dias em estufa bacteriológica comum a 37°C. No sétimo dia, após agitação e repouso, 2 mL do sobrenadante homogêneo foi retirado do tubo e a turvação ajustada em outro tubo, adicionando-se o meio de cultura 7H9, à turvação compatível ao tubo N° 3 da Escala McFarland, sendo a seguir o inóculo diluído 1:20 em Middlebrook 7H9 para ser adicionado posteriormente na microplaca.

## Preparação da placa, adição do MTT e leitura

O teste foi realizado em microplacas de 96 orifícios, fundo plano e tampa estéril (Corning). Os orifícios periféricos foram preenchidos com 200 µl de água destilada estéril, com exceção dos orifícios das colunas 10 e 11 da linha H (H10 e H11) que foram utilizados como controle do crescimento da cepa. Adicionou-se aos orifícios das colunas dois a onze, 100 µl do meio 7H9 enriquecido e nos orifícios iniciais de cada linha 100µl da solução de trabalho de cada fármaco. Assim, a sequência dos fármacos na placa foram: isoniazida, rifampicina, etambutol em solução aquosa, etambutol em solução alcoólica a 20%, estreptomicina em solução aquosa, estreptomicina em solução aquosa contendo phenol, respectivamente nas linhas B, C, D, E, F, G.

Partindo destes orifícios iniciais, com uma pipeta multicanal, foram realizadas as diluições seriadas, retirando-se 100 µl da primeira coluna e transferindo para a coluna seguinte, sucessivamente, até a coluna 11. Desta última coluna, desprezou-se 100 µl.

Em uma segunda etapa, uma alíquota de 100 µl do inóculo diluído foi adicionada, e o volume final em cada orifício tornou-se 200 µl. Nos orifícios controle do crescimento bacteriano foram adicionados o meio 7H9 e inóculo. Depois de lacradas com parafilme, as microplacas foram individualmente seladas em sacos plásticos, acondicionadas em recipientes plásticos com tampa e incubadas novamente a 37°C em estufa por mais seis a sete dias.

Preparou-se no dia do teste, uma solução do indicador colorimétrico [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT) a 5mg/mL misturando-se o indicador em 10% de etanol absoluto para auxiliar a solubilização e completou-se o restante do volume com água destilada estéril. No sexto dia, 15 µl dessa solução foi adicionado em um dos poços controle de crescimento da cepa. O aparecimento de um precipitado violeta indicou o crescimento do *M. tuberculosis*, sendo a mudança de cor do amarelo para o violeta. A verificação da mudança de cor foi realizada em 40 minutos e em

24hs. Ocorrendo a viragem, o indicador foi adicionado em todos os orifícios. Não havendo a mudança da cor, reencubou-se a placa e no dia seguinte adicionou-se a solução do MTT no outro orifício controle. Novamente, as microplacas foram seladas e incubadas durante a noite.

Verificando-se a viragem do indicador, foi realizada a leitura. A partir desse momento, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do fármaco que impediu a mudança de cor do amarelo para violeta. Os isolados foram considerados sensíveis, se as CIMs dos respectivos fármacos foram menores ou iguais aos cut offs reportados por Martin *et al* (38): INH: 0,25 µg/mL; RMF: 0,5 µg/mL; EMB: 4 µg/mL ; SM: 1 µg/mL.

### **3.5.1.3. Controle de Qualidade dos reagentes e pureza das culturas**

A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) foi utilizada na padronização do método, como referência para as cepas sensíveis e na certificação dos lotes do meio 7H9 e dos fármacos quanto à eficácia e potência.

Antes da realização do método foram realizados esfregaços de todas as cepas e coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen a fim de se confirmar a ausência de contaminação por outros microorganismos. Em adição, uma porção da colônia foi semeada em ágar sangue para reconfirmar a pureza da cultura.

Para os meios de cultura LJ e Middlebrook 7H9 realizou-se o teste de esterilidade, incubando-os após o preparo em estufa bacteriológica a 35°C por 48hs (39).

#### 3.5.1.4. Método Bactec MGIT 960®

O sistema automatizado Bactec MGIT 960® consiste na avaliação do crescimento micobacteriano através do consumo de oxigênio, medido através de um sensor fluorescente de sais de rutênio presentes nos tubos de cultura, que emitem luz em baixas concentrações de oxigênio. Inicialmente, uma grande quantidade do oxigênio dissolvido suprime as emissões do composto e pouca fluorescência pode ser detectada. Posteriormente, microrganismos respirando ativamente no meio, consomem o oxigênio o que ocasiona a emissão da fluorescência e sua detecção pelo equipamento. Uma célula fotoelétrica avalia a cada hora, a luminescência dos tubos, registrando os resultados positivos quando há emissão de luz. O método utiliza o meio Middlebrook 7H9 modificado, acrescido de oxigênio, e foi realizado de acordo com descrição do manual do fabricante pelo setor de micobactérias do Instituto Adolfo Lutz (40).

A partir do crescimento do *M.tuberculosis* no meio Löwenstein Jensen, foram preparadas suspensões com densidade de 1 na escala McFarland e diluídas (1:5) em salina estéril. Para o preparo das soluções estoque dos fármacos, 4 mL de água estéril foram adicionados aos fármacos liofilizados e as soluções foram congeladas a -20°C. Asepticamente nos tubos MGIT foram adicionados 0,8 mL do suplemento SIRE, 100µl da solução estoque do fármaco e por último 0,5mL da suspensão do microrganismo, obtendo-se as concentrações: 1,0 µg/mL para SM, 0,1 µg/mL para INH, 1 µg/mL para RMP e 5,0 µg/mL para EMB. Para cada isolado, tubos controle de crescimento contendo o inóculo diluído 1:100 e sem o fármaco foram incluídos (41).

As concentrações críticas reportadas pelo manual do fabricante para o sistema Bactec MGIT 960® (40) são respectivamente: 1,0 µg/mL e 4,0 µg/mL para SM; 0,1 µg/mL e 0,4 µg/mL para INH; 1,0 µg/mL para RMF e 5,0 µg/mL para EMB.

### **3.5.2. Dados clínico-epidemiológicos**

Os pacientes incluídos no estudo foram avaliados nos ambulatórios da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, foram informados e esclarecidos sobre o estudo e assinaram o “termo de Consentimento Livre e esclarecido” (Anexo 2).

Os dados clínico-epidemiológicos foram obtidos através do prontuário e da ficha de notificação de TB do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) (Anexo3).

As variáveis de interesse estudadas foram:

A. Demográficas: idade, sexo, etnia, município de residência, ocupação.

B. Referentes à tuberculose

B.1. Tratamento anterior para TB e evolução do tratamento

A evolução do tratamento anterior foi classificada como:

- cura: paciente que completou a terapia com ou sem pesquisa de BAAR no escarro negativa neste momento;
- óbito: pacientes que morreram durante o tratamento independente da causa;
- falência de tratamento: paciente com permanência de BAAR positivo no 4º mês após início de tratamento ou tornou-se positivo a partir deste momento;
- interrupção de tratamento (abandono): pacientes em que não foram dispensados os fármacos específicos por um mês ou mais, em qualquer instante após a notificação;

- transferência: pacientes que foram transferidos para outras unidades notificadoras e cujos resultados de tratamento foram desconhecidos;
- recaída: paciente que após ter sido considerado curado foi novamente diagnosticado com doença ativa .

B2. Apresentação clínica da tuberculose: forma (pulmonar, extrapulmonar ou pulmonar + extrapulmonar), localização das formas extrapulmonares.

C. Presença de comorbidades:

- infecção pelo HIV;
- diabetes;
- etilismo;
- outras imunossupressões: transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH); transplante de órgãos sólidos; quimioterapia; corticoterapia; uso de inibidores do TNF  $\alpha$ .

D. Desfecho do caso: óbito, transferência, abandono, falência terapêutica e cura, conforme descritos no item B1.

### **3.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS**

#### **3.6.1. Avaliação da prevalência de resistência**

Foram determinadas as prevalências de resistência aos fármacos antimicobacterianos de forma isolada e combinada, assim como resistência primária e adquirida, dos casos incluídos no grupo I. Foi definido como:

- droga resistência adquirida: aquela encontrada em pacientes que receberam no mínimo um mês de tratamento prévio com fármacos antimicobacterianos;

- droga resistência primária: a observada em pacientes sem história de tratamento prévio;
- multidrogarresistência: resistência à INH e RMP.

### 3.6.2. Avaliação do desempenho do teste colorimétrico em microplaca com sal de tetrazolium (MTT).

Para o estudo de desempenho foram considerados os casos incluídos no grupo II. O teste colorimétrico com MTT foi comparado ao Bactec MGIT 960® através dos parâmetros definidos na tabela 1.

**Tabela 1. Cálculo dos parâmetros para a avaliação do desempenho do teste diagnóstico.**

		MGIT 960®		
		Presente	Ausente	Total
MTT	Presente	a	b	a+b
	Ausente	c	d	c+d
		a+c	b+d	a+b+c+d

---

Sensibilidade =  $a / (a+c)$

Especificidade =  $d / (b+d)$

Valor preditivo positivo =  $a / (a+b)$

Valor preditivo negativo =  $d / (c+d)$

### **3.6.3. Avaliação da situação clínica**

A situação clínica foi avaliada nos seguintes períodos de tratamento específico: no 2º, no 6º, no 12º e no 18º mês a partir do início do tratamento. Foram comparados os pacientes com presença e ausência de resistência quanto à evolução para cura, óbito, falência, abandono e transferência conforme definido no item B1.

### **3.6.4. Análise estatística**

A avaliação descritiva das características dos sujeitos estudados e a análise univariada foram realizadas através do aplicativo Epi-Info 6®. Variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste qui-quadrado (Yates); quando o valor esperado de uma célula foi menor que cinco o teste exato de Fisher bi-caudal foi utilizado. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

### **3.7. Aspectos éticos da pesquisa**

O projeto foi submetido e aprovado sem restrições pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Devido ao caráter operacional do estudo, não implicando em riscos diretos aos pacientes e uma vez que os procedimentos aos quais os mesmos foram submetidos constituem instrumentos normatizados para o diagnóstico laboratorial da TB, os novos testes diagnósticos foram realizados em paralelo àqueles previamente padronizados, o que não

acarretou prejuízo diagnóstico para a condução individual dos casos. Os pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 2).

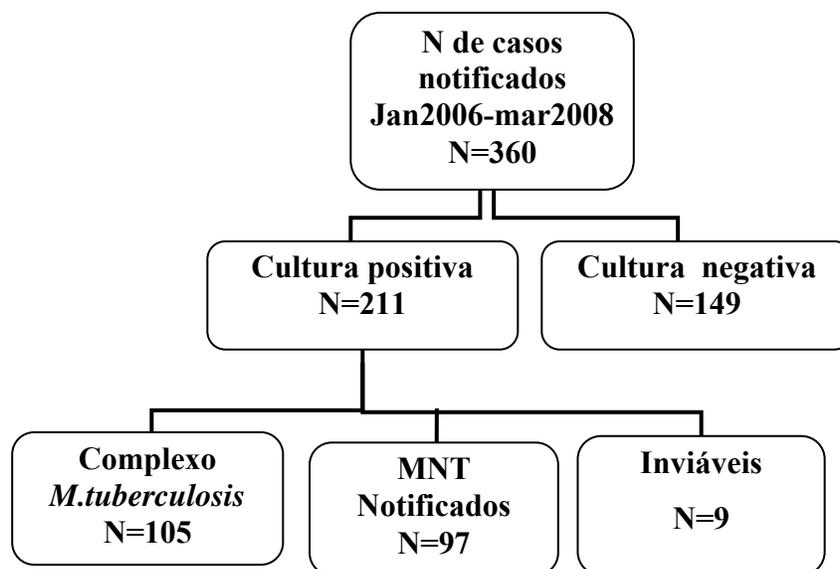
### **3.8. Suporte Financeiro**

Este projeto recebeu auxílio-pesquisa do Fundo de apoio ao ensino e pesquisa da Universidade estadual de Campinas (FAEP-UNICAMP) e da *Japan International Cooperation Agency*.

## ***4.RESULTADOS***

#### 4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Durante o período de estudo foram notificados no HC-Unicamp 360 casos de TB, sendo que 211 apresentaram cultura positiva para *Mycobacterium sp*, destas 105 foram identificadas como pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e incluídas no grupo I para estudo de prevalência (figura 4).



**Figura 4- Casos notificados no período de janeiro 2006 a março de 2008 de acordo com os resultados da cultura para micobactéria.**

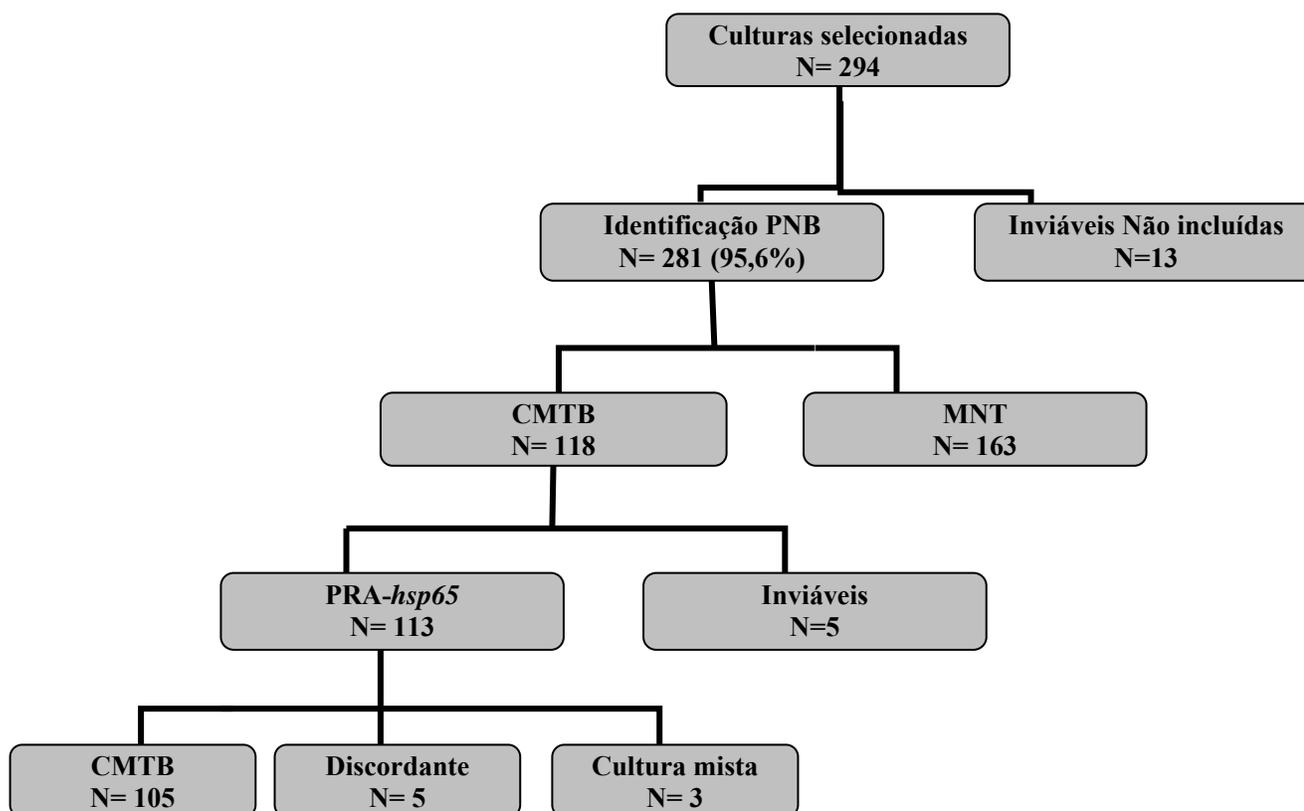
A seleção a partir das culturas identificou 294 culturas positivas para *Mycobacterium sp* no período de estudo. Foram viáveis para identificação da espécie 281 culturas. Dentre estes casos, haviam sido notificados 58,6% (211) com cultura positiva para *Mycobacterium sp*. O número residual de casos com culturas positivas não notificados (70) correspondem aqueles já previamente identificados como MNT e, portanto não passíveis de notificação no SINAN como tuberculose (Figura 4).

Das 294 culturas selecionadas, tornaram-se inviáveis 13 (4,42%) devido à ocorrência de morte das células micobacterianas ou contaminação das culturas. Foram

identificados 281(95,6%) isolados, através do método de inibição seletiva pelo ácido p-nitrobenzóico (PNB).

Houve concordância entre os métodos PNB realizado pela pesquisadora e o PRA-*hsp65* realizado pelo IAL-SP em 97,1% dos isolados. A discordância ocorreu em 8 isolados: em cinco que foram identificados pelo PNB como CMTB e em três identificados como cultura mista pelo PRA- *hsp 65* (IAL-SP).

Para o estudo de prevalência foram incluídos 105 isolados correspondentes aos 105 pacientes identificados no banco de notificações de tuberculose (figura 5).



**FIGURA 5 – Algoritmo dos resultados da identificação pelo PNB e PRA- *hsp65* (IAL-SP).**

## 4.2. RESULTADOS DO ESTUDO DE PREVALÊNCIA

### 4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA

Dentre os 105 pacientes incluídos no estudo de prevalência, 78 (74,3%) pertenciam ao sexo masculino, sendo a relação entre o número de pacientes do sexo masculino e feminino igual a 2,9. Sessenta e nove (65,7%) eram caucasóides e a mediana de idade foi de 36 anos, com predominância de procedência de cidades pertencentes à DRS XII (anexo 5), do estado de São Paulo, como mostra a tabela 2.

A apresentação exclusivamente pulmonar ocorreu em 68 (64,8%) casos, extrapulmonar isolada em 11 (10,5%) e extrapulmonar associada à pulmonar em 26 (24,7%) pacientes. Doença disseminada ocorreu em 7 (18,9%). A localização extrapulmonar mais frequente foi a pleural [7 (18,9%)]. Oitenta e dois pacientes (78,1%) apresentaram alterações à radiografia de tórax classificadas como suspeita de TB (tabela 3).

Dentre os 94 (89,5%) pacientes com envolvimento pulmonar (exclusivo ou associado ao extrapulmonar), a pesquisa de BAAR no escarro foi positiva em 66 (62,9%), sendo a positividade da cultura no escarro de 78,1%. Para os outros espécimes a pesquisa de BAAR foi positiva em 13 (12,4%), e a cultura em 39 (37,1%) casos. A histopatologia foi realizada em 19 (18,1%) casos, sendo sugestiva de TB em 10 (9,5%) e houve visualização de BAAR em um caso (Tabela 4).

Apresentaram coinfeção pelo HIV 39 (37,1%) pacientes e em 14 o teste para HIV não foi realizado ou o resultado ignorado. Etilismo e outras doenças foram encontrados em 19 (18,1%) e 30 (31,3%) casos, respectivamente (Tabela 5).

Quanto ao tipo de ingresso, a maior frequência foi de casos novos (95). Estavam em retratamento 9: recidiva em seis (5,7%) e reingresso após abandono em três (2,8%). Um caso incluído apresentava falência terapêutica (Tabela 6).

**Tabela 2. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo as características demográficas, de janeiro de 2006 a março de 2008.**

<b>Característica</b>	<b>N= 105</b>	<b>%</b>
<b>Idade (anos)</b>		
Mediana (mínimo – máximo)	36 (19-85)	———
<b>Etnia</b>		
Caucasóide	69	65,7
Negróide/asiática	34	32,4
Ignorado	2	1,9
<b>Procedência</b>		
Campinas	38	36,2
Outros municípios: - DRS XII	54	51,4
- Outros municípios SP	11	10,5
- Outro estado	2	1,9

**Tabela 3. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo as características de apresentação clínica, de janeiro de 2006 a março de 2008.**

<b>Característica</b>	<b>N=105</b>	<b>%</b>
<b>Forma da TB</b>		
Pulmonar	68	64,8
Extrapulmonar	11	10,5
Pulmonar + Extrapulmonar	26	24,7
<b>Localização extrapulmonar</b>		
Miliar/disseminada	7	18,9
Pleural	7	18,9
Ganglionar	7	18,9
Genitourinária	4	10,8
Meníngea	4	10,8
Ocular	1	2,7
Laríngea	3	8,1
Seios da face	1	2,7
Óssea	3	8,1

**Tabela 4. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo as características microbiológicas, de janeiro de 2006 a março de 2008.**

<b>Característica</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Pesquisa de BAAR escarro (P e PEP)</b>		
Negativa/ não realizada	39	37,1
<b>Pesquisa de BAAR em outros espécimes</b>		
Negativa/ não realizada	92	87,6
<b>Cultura de micobactéria do escarro</b>		
Positivo	82	78,1
Negativo	11	10,5
<b>Cultura de micobactéria de outro espécime</b>		
Positivo	39	37,1
Negativo	9	8,6
<b>Histopatologia</b>		
Sugestivo	10	9,5
Não sugestivo	8	7,6
Não realizado	85	80,9
BAAR positivo	1	1,0

**P: pulmonar ; PEP: pulmonar e extrapulmonar**

**TABELA 5. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo a presença de comorbidades, de janeiro de 2006 a março de 2008.**

<b>Comorbidade</b>	<b>N*</b>	<b>%</b>
<b>Infecção pelo HIV</b>	39	37,1
<b>Etilismo</b>	19	18,1
<b>Hepatopatia</b>	16	5,7
<b>Pneumopatia crônica</b>	12	11,4
<b>Neoplasia</b>	8	7,6
<b>Paracoccidiodomicose</b>	2	1,9
<b>Insuficiência Renal crônico (Tx renal)</b>	2	1,9
<b>Intestinal (doença de Crohn, úlcera duodenal)</b>	2	1,9
<b>Síndrome Mielodisplásica</b>	1	1,0
<b>Histiocitose</b>	1	1,0
<b>Sequela neurológica pós-meningite</b>	1	1,0

**\* O número total de casos ultrapassa 105 em virtude da coexistência de comorbidades.**

**Tabela 6. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos segundo tratamento antimicobacteriano prévio, de janeiro de 2006 a março de 2008.**

<b>Tipo de ingresso</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Caso novo	95	90,5
Falência	1	0,95
Recidiva	6	5,70
Reingresso após abandono	3	2,85
Total	105	100

#### **4.2.2. Prevalência de resistência aos fármacos antimicobacterianos**

Dos 105 pacientes incluídos no estudo de prevalência, 7 (6,7%) apresentaram resistência a qualquer um dos fármacos testados e multidrogarresistência (isoniazida + rifampicina) foi observada em um caso (1,0%). Para isoniazida ou estreptomicina a frequência foi de quatro casos (3,8%) (Tabela 7). Dos sete pacientes resistentes, quatro estavam no primeiro tratamento, e os demais: dois em retratamento (um recidiva e um após abandono) e um em falência. Nestes três casos a mudança terapêutica já havia sido realizada devido ao histórico de tratamento anterior.

Foi evidenciada associação entre história de tratamento prévio e resistência ( $p=0,0181$ ). Não houve associação, no grupo avaliado, entre resistência e comorbidades (HIV, *Diabetes mellitus* e etilismo) e nem à evolução final do caso (Tabela 8).

**Tabela 7. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose incluídos de acordo com o perfil de susceptibilidade aos fármacos, pelos métodos MMTT e Bactec MGIT960®\*.**

<b>Fármacos</b>	<b>R</b> <b>N=7</b>	<b>%</b>	<b>S</b> <b>N= 98</b>	<b>%</b>
Isoniazida	4	3,8	101	96,2
Rifampicina	1	1,0	104	99,0
Etambutol	-	-	105	100
Estreptomicina	4	3,8	101	96,2
Isoniazida + Rifampicina	1	1,0	104	99,0
Total	7	6,7	98	93,3

**\*Para os casos discordantes foi considerado o resultado do Bactec MGIT960®.**

**R: resistente**

**S: sensível**

**Tabela 8. Distribuição dos 105 pacientes de acordo com as características demográficas, clínico-epidemiológicas e evolução segundo o perfil de susceptibilidade aos fármacos antimicobacterianos.**

Característica	Resistência		Sensibilidade		p	OR (IC95%)
	N=7	%	N=98	%		
<b>Gênero masculino</b>	5	6,4	73	93,6	1,000	0,86(0,13-6,85)
<b>Idade (20 a 59)</b>	7	7,3	89	92,7	1,000	Indefinido
<b>Etilismo</b>	2	10,5	17	89,4	0,607	1,91 (0,21-2,6)
<b>Internação hospitalar prévia</b>	3	7,0	40	93,0	1,000	0,9 (0,15-5,16)
<b>História de tto prévio para TB</b>	3	30,0	7	70,0	<b>0,0181</b>	9,75(1,37-69,74)
<b>Infecção HIV</b>	3	7,7	36	92,3	0,709	1,29(0,21- 7,38)
<b>Envolvimento pulmonar</b>	7	7,4	87	92,6	1,000	Indefinido

#### **4.2.3. Desfecho clínico dos casos avaliados no estudo de prevalência**

Dos 105 pacientes incluídos, 67 (63,8%) evoluíram para cura, 26 (24,7%) para óbito e 12 (11,4%) para abandono ao final de 18 meses de seguimento (Tabela 9).

Dos sete casos resistentes, três evoluíram para a cura no 9º e 18º mês, dois para óbito, no 9º e no 18º mês. Dois casos de abandono foram observados no segundo e nono mês (Tabelas 10, 11, 12, 13, 14).

Não houve diferença estatisticamente significativa de evolução para cura entre o grupo sensível e o resistente (p=0,69).

**Tabela 9. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica por mês de tratamento.**

Mês de tratamento	Cura	Abandono	Óbito
2º	0	2	16*
6º	14	8	5
9º	40	1	4
12º	8	0	0
18º	5	1	1
TOTAL	67	12	26

\* Destes 14 no primeiro mês.

**Tabela 10. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no segundo mês de tratamento e a presença de resistência.**

Situação Clínica	Susceptibilidade							
	Qualquer fármaco		Isoniazida		Rifampicina		Isoniazida + rifampicina	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Abandono	1	2	1	2	0	2	0	2
Óbito	0	16	0	16	0	16	0	16
Em tratamento	6	74	3	77	1	80	1	80

R: resistente; S: sensível

**Tabela 11. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no sexto mês de tratamento e a presença de resistência.**

Situação Clínica	Susceptibilidade							
	Qualquer fármaco		Isoniazida		Rifampicina		Isoniazida + rifampicina	
	R	S	R	S	R	S	R	S
<b>Cura</b>	1	14	0	14	0	14	0	14
<b>Óbito</b>	0	21	0	21	0	21	0	21
<b>Abandono</b>	1	9	1	9	0	10	0	10
<b>Em tratamento</b>	6	53	3	57	1	59	1	59

R: resistente ; S: sensível

**Tabela 12. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no nono mês de tratamento e a presença de resistência.**

Situação Clínica	Susceptibilidade							
	Qualquer fármaco		Isoniazida		Rifampicina		Isoniazida + rifampicina	
	R	S	R	S	R	S	R	S
<b>Cura</b>	2	52	0	54	0	54	0	54
<b>Óbito</b>	1	24	0	25	0	25	0	25
<b>Abandono</b>	1	10	1	10	0	11	0	11
<b>Em tratamento</b>	3	12	3	12	1	14	1	14

R: resistente ; S: sensível

**Tabela 13. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no décimo segundo mês de tratamento e a presença de resistência.**

Situação Clínica	Susceptibilidade							
	Qualquer fármaco		Isoniazida		Rifampicina		Isoniazida + rifampicina	
	R	S	R	S	R	S	R	S
<b>Cura</b>	2	60	0	60	0	60	0	60
<b>Óbito</b>	1	24	0	25	0	25	0	25
<b>Abandono</b>	1	10	1	10	0	11	0	11
<b>Em tratamento</b>	3	4	3	6	1	8	1	8

R: resistente ; S: sensível

**Tabela 14. Distribuição dos 105 pacientes com tuberculose, de acordo com a situação clínica no décimo oitavo mês de tratamento e a presença de resistência.**

Situação Clínica	Susceptibilidade							
	Qualquer fármaco		Isoniazida		Rifampicina		Isoniazida + rifampicina	
<b>Cura</b>	3	64	1	66	1	66	1	66
<b>Óbito</b>	2	24	1	25	0	26	0	26
<b>Abandono</b>	2	10	2	10	0	12	0	12

R: resistente ; S: sensível. Todos os pacientes que haviam sido transferidos nos meses anteriores evoluíram para cura.

#### **4.3. Utilidade do método colorimétrico de microdiluição em placa com sal de tretrazolium na avaliação de resistência do *M. tuberculosis* comparado ao Bactec MGIT 960®.**

##### **4.3.1. Desempenho do MMTT**

Para o estudo de utilidade do MTT foram incluídos além dos 105 isolados do estudo de prevalência, 14 isolados com resistência conhecida através do MGIT 960®, definida pelo IAL-SP, totalizando 119 cepas. A resistência pré-estabelecida dos 14 isolados é mostrada na tabela 15.

**Tabela 15. Distribuição dos 14 isolados resistentes incluídos no grupo II (desempenho) de acordo com a susceptibilidade aos fármacos de primeira linha, pelo Bactec MGIT-960®.**

		N=14		
Fármaco	R	%	S	%
Isoniazida	11	78,6	3	21,4
Rifampicina	9	64,2	5	35,7
Etambutol	2	14,3	12	85,7
Estreptomicina	7	50,0	7	50,0
Isoniazida + Rifampicina	8	57,1	6	42,9

R: resistente ; S: sensível.

Das 119 cepas avaliadas pelo MMTT e comparadas ao Bactec MGIT 960®, houve concordância de 100% para INH e EMB, com cut offs de 0,25 µg/mL e de 4 µg/mL, respectivamente. Para rifampicina (cut off: 0,5 µg/mL), houve discordância em um isolado: resistente pelo Bactec MGIT e sensível pelo MMTT. Em relação à estreptomicina houve discordância em cinco casos (Tabelas 16 e 17).

**Tabela 16. Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com o perfil de susceptibilidade aos fármacos, pelos métodos MMTT e Bactec MGIT960®.**

Fármaco	Bactec MGIT 960®	S	MTT		Total
			R	PR	
Isoniazida	S	104	—	—	104
	R	—	15	—	15
Rifampicina	S	109	—	—	109
	R	1	9	—	10
Etambutol	S	117	—	—	117
	R	—	2	—	2
Estreptomicina	S	108	—	—	108
	R	1	6	4	11

S: sensível ; R: resistente; PR: parcialmente resistente

**Tabela 17. Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com o desempenho do MMTT comparado ao Bactec MGIT 960®.**

<b>Fármaco</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>	<b>Especificidade (%)</b>	<b>VPP (%)</b>	<b>VPN (%)</b>
Isoniazida	100	100	100	100
Rifampicina	90	100	100	99
Etambutol	100	100	100	100
Estreptomicina	90,9	100	100	99,1

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

#### **4.3.3. Concentração inibitória mínima dos isolados de *M. tuberculosis* frente aos fármacos**

Para os casos sensíveis a INH, a predominância da concentração inibitória mínima foi de 0,015 µg/mL em 45 (37,81%) isolados, enquanto que nos isolados resistentes, a CIM predominante foi de 16 µg/mL (maior concentração testada) (Tabela 18).

Para rifampicina ocorreu predomínio nos extremos inferiores (<0,06 µg/mL) para as cepas sensíveis. Para as cepas resistentes, a maior concentração testada (32 µg/mL) apresentou a frequência de 7 (77,8%) cepas dentre as 9 resistentes pelo MMTT. Para o isolado discordante entre os métodos Bactec MGIT 960® e MMTT a CIM foi de 0,5 µg/mL (Tabela 19).

Observou-se uma tendência a CIMs menores para cloridrato de etambutol diluído em etanol, sendo o valor de 0,25 µg/mL obtido para 29 cepas (24,37%) (Tabela 20), enquanto que diluído em água, foi mais frequente o valor de 1 µg/mL, observado em 30 casos (25,21%).

A tabela 21 mostra a distribuição dos casos em relação às concentrações inibitórias mínimas para EMB-a e EMB-e. Em um total de 85 (71,5%) isolados as CIMs para EMB-e foram menores em relação aos obtidos para EMB-a, e para 34 (28,5%) os valores foram iguais nas duas soluções do fármaco.

Tanto para a estreptomicina diluída em água, quanto para a estreptomicina diluída em phenol/água a maior parte dos isolados susceptíveis apresentaram CIMs inferiores a 0,25, ou seja, 79,8% e 84,9%, respectivamente (Tabela 22). Cinquenta e três (44,5%) isolados apresentaram CIMs similares para as duas soluções do fármaco. Em um total de 45 (37,8%) isolados, a CIM para SM-a foi maior em relação aos obtidos para SM-p, e para 21 (17,7%) casos as concentrações mínimas para a solução SM-a foram menores (Tabela 23).

Ao avaliar a CIM de acordo com o tipo de ingresso do caso, observou-se que o isolado do paciente que havia tido falência terapêutica apresentou os maiores valores tanto para a isoniazida como para a rifampicina. Dentre os casos novos houve uma maior frequência de CIMs nos dois valores inferiores (Tabelas 24 e 25).

**Tabela 18. Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) para a isoniazida.**

<b>CIM-INH (0,015-16µg/mL)</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
0,015	45	37,8
0,030	31	26,1
0,060	22	18,5
0,120	6	5,0
<b>0,500</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>1,000</b>	<b>4</b>	<b>3,4</b>
<b>2,000</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>
<b>4,000</b>	<b>1</b>	<b>0,8</b>
<b>8,000</b>	<b>2</b>	<b>1,7</b>
<b>16,000</b>	<b>5</b>	<b>4,2</b>
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>

Cut off: 0,25 µg/mL

**Tabela 19. Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) para a rifampicina**

<b>CIM- R 0,003-32µg/mL</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
0,003	36	30,25
0,007	27	22,70
0,015	14	11,76
0,030	16	13,44
0,060	6	5,04
0,120	6	5,04
0,250	4	3,36
0,500	1	0,84
<b>8,000</b>	<b>1</b>	<b>0,84</b>
<b>16,000</b>	<b>1</b>	<b>0,84</b>
<b>32,000</b>	<b>7</b>	<b>5,88</b>
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>

Cut off: 0,5 µg/mL

**Tabela 20. Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) para cloridrato de etambutol diluído em água (EMB-a) e etanol (EMB-e).**

<b>CIM-EMB-a</b> <b>0,030-16,000 µg/mL</b>	<b>Freq</b>	<b>%</b>	<b>CIM EMB-e</b>	<b>Freq</b>	<b>%</b>
0,030	1	0,84	0,030	5	4,20
0,060	7	5,88	0,060	17	14,29
0,120	11	9,24	0,120	18	15,13
0,250	17	14,30	0,250	29	24,37
0,500	23	19,33	0,500	25	21,00
1,000	30	25,21	1,000	17	14,29
2,000	19	15,96	2,000	6	5,04
4,000	9	7,56	4,000	—	—
<b>8,000</b>	<b>1</b>	<b>0,84</b>	<b>8,000</b>	<b>1</b>	<b>0,84</b>
<b>16,000</b>	<b>1</b>	<b>0,84</b>	<b>16,000</b>	<b>1</b>	<b>0,84</b>
<b>Total</b>	119	100	<b>Total</b>	119	100

Freq: frequência ; Cut off: 4 µg/mL

**Tabela 21. Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a comparação das concentrações inibitória mínima (CIM) para etambutol diluído em água (EMB- a) e etanol (EMB-e).**

CIM EMB-a µg/mL	CIM EMB-e µg/mL									
	0,015	<0,03	0,06	0,12	0,25	1,0	0,5	2,0	8,0	16
0,03	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,06	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0
0,12	1	1	6	2	0	0	0	0	0	0
<b>0,25</b>	0	0	4	5	8	0	0	0	0	0
<b>0,5</b>	1	0	1	7	9	7	0	0	0	0
<b>1,0</b>	0	0	0	1	6	16	8	0	0	0
<b>2,0</b>	0	0	1	2	5	1	7	3	0	0
<b>4,0</b>	0	0	0	1	1	1	3	3	0	0
<b>8,0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>16,0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>29</b>	<b>25</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

**Tabela 22. Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) para sulfato de estreptomicina diluído em água (S-A) e água + phenol (SM-p).**

<b>CIM SM-a µg/mL</b>	<b>Freq</b>	<b>%</b>	<b>CIM SM-p µg/mL</b>	<b>Freq</b>	<b>%</b>
≤ 0,01	26	21,85	≤ 0,01	34	28,57
0,03	20	16,81	0,03	28	23,53
0,06	28	23,53	0,06	25	21,00
0,12	21	17,65	0,12	14	11,78
0,25	4	3,36	0,25	5	4,20
0,50	7	5,88	0,50	2	1,68
1,00	3	2,52	1,00	1	0,84
<b>2,00</b>	<b>4</b>	<b>3,36</b>	<b>2,00</b>	<b>3</b>	<b>2,52</b>
<b>4,00</b>	<b>2</b>	<b>1,68</b>	<b>4,00</b>	<b>3</b>	<b>2,52</b>
<b>8,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8,00</b>	<b>2</b>	<b>1,68</b>
<b>16,00</b>	<b>4</b>	<b>3,36</b>	<b>16,00</b>	<b>2</b>	<b>1,68</b>
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>—</b>	<b>119</b>	<b>100</b>

Freq: frequência ; cut off: 1 µg/mL

**Tabela 23. Distribuição dos 119 isolados incluídos no grupo II, de acordo com a comparação das concentrações inibitória mínimas (CIM) para sulfato de estreptomicina diluído em água (SM-a) e água + phenol (SM-p).**

CIM SM-a µg/mL	CIM SM-p											
	≤0,01	0,03	0,06	0,12	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0	16	
≤0,01	21	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,03	5	9	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0,06	4	11	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0
0,12	4	1	9	5	2	0	0	0	0	0	0	0
<b>0,25</b>	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0
<b>0,5</b>	0	3	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0
<b>1,0</b>	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>2,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>4,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>8,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>16,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>29</b>	<b>25</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

**Tabela 24. Distribuição dos 105 casos do grupo I de acordo com a comparação da CIM da isoniazida (CMI-I) e tipo do ingresso de caso.**

CIM-I µg/mL	Caso Novo		Recidiva		Retratamento		Falência	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0,015	40	38,1	4	2,9	1	1,0	0	0
0,03	27	25,7	1	1,0	1	1,0	0	0
0,06	20	19,0	1	1,0	0	0	0	0
0,12	6	5,7	0	0	0	0	0	0
<b>0,50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	0	0	0	0
<b>1,00</b>	1	1,0	0	0	0	0	0	0
<b>2,00</b>	<b>1</b>	<b>1,0</b>	0	0	0	0	0	0
<b>4,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0
<b>8,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1,0</b>	0	0
<b>16,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1,0</b>
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>90,5</b>	<b>6</b>	<b>5,7</b>	<b>3</b>	<b>3,0</b>	<b>1</b>	<b>1,0</b>

Cut off: 0,25 µg/mL

**Tabela 25. Distribuição dos 105 casos do grupo I de acordo com a comparação da CIM da rifampicina e tipo ingresso do caso**

CIM-R µg/mL	Caso Novo		Recidiva		Retratamento		Falência	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0,003	35	33,3	0	0	0	0	0	0
0,007	24	22,8	1	1,0	1	1,0	0	0
0,015	11	10,4	1	1,0	1	1,0	0	0
0,03	14	13,3	3	2,8	0	0	0	0
0,06	3	2,8	1	1,0	0	0	0	0
0,12	4	3,8	0	0	1	1,0	0	0
0,25	4	3,8	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>1,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>2,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>4,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>8,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>16,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>32,00</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1,0</b>
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>90,5</b>	<b>6</b>	<b>5,7</b>	<b>3</b>	<b>3,0</b>	<b>1</b>	<b>1,0</b>

Cut off: 0,5 µg/mL

## ***5. DISCUSSÃO***

## 5.1. PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS DE PRIMEIRA LINHA

As características demográficas da população avaliada representam a população adulta com tuberculose atendida em hospitais de referência de áreas metropolitanas. No grupo avaliado ocorreu presença de infecção pelo HIV em 37,1 % semelhante aos estudos de Fandinho *et al*, que observou coinfeção pelo HIV em 39,1% dos casos (42).

A resistência geral para os fármacos testados, no presente estudo foi de 6,7%. Foi mais prevalente a resistência à INH e SM, correspondente a 3,8% para cada fármaco. Multidrogarresistência (resistência à INH e RMP) foi observada em apenas um caso (1%). Prevalência mais elevada foi evidenciada em recente estudo em um hospital terciário localizado no Rio de Janeiro, com resistência inicial em 15,7% dos casos. Neste mesmo estudo resistência à INH foi de 10,9%, seguido da estreptomicina (7,7%) e de MDR em 4,3% (43). Assim como no presente estudo as mais elevadas taxas de resistência foram para INH e SM, porém foram superiores, possivelmente devido as diferenças entre os estudos como: o período de inclusão (quatro anos), o número de casos estudados e a localidade de realização do estudo.

Os resultados inferiores da prevalência de resistência do presente estudo podem ser explicados pelas características da população estudada, que incluem: o número de casos avaliados, a maior frequência de pacientes com ausência de tratamento prévio (90,5%) e o coeficiente de incidência da área metropolitana de Campinas (40/100.000) que é inferior, se comparado aos coeficientes de São Paulo e Rio de Janeiro.

Natal *et al*,1997 (44), relataram em pesquisa realizada em unidades de atendimento primário brasileiras, prevalência de TB-MDR em 0,9% dos casos. Similar

prevalência (1%) foi observada em estudo de base populacional na cidade de São Paulo, entre casos novos oriundos de quatro centros de saúde (9).

No inquérito de vigilância de resistência realizado pela OMS (1994-1997), a resistência a qualquer fármaco foi de 8,6% e de TB- MDR de 0,9% (1). No Brasil, estudos de TB-MDR com base hospitalar, apresentaram prevalência de 5% (2/42) em indivíduos infectados pelo HIV (Campinas) (45), 10,2% (23/265) em pacientes hospitalizados (Rio de Janeiro) (43); 11,3% (49/431) entre pacientes infectados pelo HIV (São Paulo) (46). A tabela 26, mostra dados de prevalência encontrados no Brasil nos últimos anos, onde a prevalência de resistência a todos os fármacos e MDR nos estudos de base hospitalar se apresentam elevadas se comparadas aos dados encontrados nesta série. Estudos de base hospitalar realizados em países em desenvolvimento evidenciam valores de resistência aos fármacos superiores aos encontrados em estudos brasileiros (Tabela 27).

**Tabela 26. Estudos brasileiros de prevalência de resistência aos fármacos antimicobacterianos.**

<b>Autor (base)</b>	<b>Nº</b>	<b>Qualquer fármaco R %</b>	<b>INH R %</b>	<b>RMP R %</b>	<b>MDR R %</b>	<b>SM R %</b>
Aguiar <i>et al</i> , 2009 (hospitalar) (43)	350	15,7	10,9	4,9	4,3	7,7
Souza <i>et al</i> , 2006 (hospitalar) (47)	313	19,2	—	—	3,8	—
Brito <i>et al</i> , 2005 (hospitalar) (11)	165	13,3	13,0	3,6	3,6	10,3
Telles <i>et al</i> , 2005 (populacional) (9)	420	15,5	—	—	1 e 16,7*	—
Lemos <i>et al</i> , 2007 ( hospitalar) (48)	1695	13,2	2,7	4,0	4,4	—

\*Foi observado 1 % de MDR entre os casos novos e 16,7% entre os pacientes com tratamento prévio para TB.

**Tabela 27. Estudos de prevalência de resistência aos fármacos antimicobacterianos, de base hospitalar, em países em desenvolvimento.**

<b>Estudo</b>	<b>País</b>	<b>N</b>	<b>Qualquer fármaco R %</b>	<b>INH R %</b>	<b>RMP R %</b>	<b>MDR R %</b>	<b>SM R %</b>
Liaw <i>et al</i> , 2004 (49)	Taiwan	1411	30,5	19,0	6,1	5,1	10,0
Senol <i>et al</i> , 2005 (50)	Turquia	1100	16,5	9,9	9,2	5,8	8,5
Harrow <i>et al</i> , 1998 (51)	Guatemala	376	30,0	21,0	5,0	15,0	21,0
Lee J <i>et al</i> , 2001 (52)	Koréia	308	—	—	—	10,1	—

R: resistência

## 5.2 FATORES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA

Neste estudo, não houve associação entre comorbidades (infecção pelo HIV, diabetes *melitus*, etilismo) e resistência, resultado obtido provavelmente devido ao reduzido tamanho da amostra. Em concordância com dados anteriores, houve relação entre tratamento prévio e resistência ( $p=0,0181$ ). Resultado similar foi observado por Brito *et al* (11) em estudo de base hospitalar, onde o desenvolvimento de resistência não se associou a infecção pelo HIV e nem a presença de etilismo. Neste mesmo estudo foi reportada significativa resistência entre profissionais de saúde, esta variável não foi analisada de forma consistente no presente estudo.

Diferentemente destes resultados, significativa relação entre infecção pelo HIV e MDR foi evidenciada em estudo hospitalar que avaliou 265 pacientes no Rio de Janeiro. Nesta mesma pesquisa, houve associação entre tratamento prévio e resistência, mas as variáveis etilismo e desemprego não apresentaram significativa relação com resistência (42).

Em estudo de coorte realizado em um Instituto de Referência de São Paulo, durante quatro anos, foram associados à resistência: tratamentos anteriores, etilismo e falência aos esquemas de retratamento (53). Pesquisa realizada em um hospital terciário do Rio de Janeiro demonstrou a associação MDR à presença de cavidade pulmonar e recaída no intervalo de dois anos (43).

## 5.3. DESFECHO DOS CASOS DE ACORDO COM O PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS.

Desfecho favorável (cura) foi observado em 65,3% dos casos sensíveis e em 42,8% dos casos resistentes. Não houve associação estatisticamente significativa entre óbito e resistência, provavelmente devido ao tamanho insuficiente da amostra. Em

estudo realizado em um hospital terciário de São Paulo, referência para aids (Instituto de Infectologia Emílio Ribas), foram avaliados 1695 pacientes, sendo o desfecho favorável para os casos sensíveis e para os resistentes de 45,5% e 28,1% respectivamente, valores que se apresentam significativamente inferiores se comparados aos encontrados nesta série, mas que igualmente refletem a maior frequência de cura para os casos sensíveis (48).

Neste mesmo estudo, evolução para óbito foi observado em 23,9% dos casos sensíveis e 40,5% dos resistentes, e abandono em 31,3% dos casos resistentes, caracterizando a associação entre resistência e óbito e resistência/abandono, resultado diverso ao apresentado no presente estudo. Deve ser destacado que no estudo de Lemos *et al*, 2007 a maior parte da casuística tratava-se de pacientes com infecção pelo HIV.

Outros estudos têm sido realizados em hospitais terciários brasileiros, entretanto a relação entre desfecho e resistência nem sempre tem sido estabelecida, devido ao fato de que os testes de susceptibilidade não têm sido realizado para todos os casos ingressantes, mas apenas para aqueles recomendados pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Em estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, a taxa de cura (comprovada e não comprovada) foi de 79%, neste estudo o perfil de susceptibilidade não foi avaliado de forma rotineira (54).

No presente estudo houve apenas um caso com TB-MDR, que evoluiu para cura. Em estudo de Siqueira *et al* (55), em centro de referência para TB-MDR houve evolução favorável em apenas 36% dos 50 pacientes avaliados. A multidrogarresistência limita o desfecho dos casos, como demonstrado em avaliação realizada pela OMS no ano 2000, em países com elevado número de casos. Neste mesmo estudo foi observada taxa de cura em 58% dos pacientes com TB-MDR no Peru e 60% em Hong Kong, mesmo com 100% de observação dos casos. A alta prevalência de mortalidade e falência ilustram o negativo impacto da resistência aos fármacos no desfecho clínico dos casos. (56).

#### 5.4. UTILIDADE DO PNB NA TRIAGEM PARA A IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

No presente estudo, foi observada a concordância de 97,1% para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* entre a identificação da espécie pelo PNB quando comparado ao PRA-*hsp65* realizado pelo IAL. Entretanto os isolados identificados como MNTs pelo PNB não foram avaliados de forma sistemática, por não fazer parte do escopo do presente estudo. É importante ressaltar que houve um número expressivo de MNT, cujo isolamento pode ser de caráter contaminante ou colonizador transitório, já que muitas dessas espécies não apresentam características patogênicas.

O método PNB é útil na diferenciação de CMTB e MNT e se constitui uma alternativa de baixo custo que pode ser utilizada como triagem; permite de uma forma prática agilizar a informação preliminar da espécie e direcionar os testes de sensibilidade aos fármacos, sendo a média de obtenção dos resultados a partir da cultura de dez a treze dias, podendo ser feito diretamente no frasco de cultivo (MB-Bact ou Bactec MGIT 960®) (55,56). Giampaglia *et al*, 2005 (37), obtiveram acurácia de 99,4% com a utilização do PNB no sistema manual BBL MGIT a partir de cultura em Löwenstein Jensen . Uma desvantagem associada à identificação da espécie pelo PNB é de que existem relatos da existência de algumas cepas de *M. tuberculosis* susceptíveis ao PNB, o que pode contribuir para a obtenção de resultados discordantes (59). Outros métodos bioquímicos de identificação clássicos também apresentam baixo custo, mas são laboriosos e demandam tempo.

Os métodos genotípicos para a identificação da espécie permitem abreviar o tempo e apresentam boa especificidade, entretanto estas técnicas requerem laboratórios capacitados, treinamento especializado, excelentes procedimentos de controle de qualidade, além de recursos para a manutenção dos custos operacionais (60).

## **5.5. UTILIDADE DO TESTE COLORIMÉTRICO DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA COM SAL DE TETRAZOLIUM PARA AVALIAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE DO *M. TUBERCULOSIS***

### **5.5.1. Desempenho do MMTT**

Neste estudo, INH e RMF apresentaram elevados valores de sensibilidade (100% e 90%) e especificidade (100% e 100%). Considerando os dados da tabela 28, estudos demonstraram alta sensibilidade e especificidade para o método, em concordância com os resultados obtidos nesta série. A sensibilidade do MTT para a rifampicina se apresenta menor se comparada ao resultado descrito por Palomino *et al* (61). A discordância neste estudo foi de um isolado sensível pelo MMTT e resistente para o Bactec MGIT 960®, sendo obtido o valor de sensibilidade de 90% devido ao reduzido número de isolados resistentes para este fármaco.

Para etambutol, foram encontrados valores elevados tanto de sensibilidade quanto de especificidade, porém não foi possível testar o desempenho para isolados resistentes devido ao reduzido tamanho da amostra (n=2). Durante o período do estudo não foi observada resistência ao EMB.

Os valores de sensibilidade e especificidade do MMTT encontrados no presente estudo, para estreptomicina foram de 90,9% e 99%. Foram observados no estudo valores discrepantes para este fármaco em alguns isolados, com CIMs de uma diluição acima do ponto de corte (2µg/mL), sendo considerados parcialmente resistentes pelo MMTT e resistentes pelo Bactec MGIT 960® (Tabela 16). Em virtude de observações semelhantes, alguns autores (31,62,63) têm sugerido o uso de três categorias de susceptibilidade para os fármacos de primeira linha: susceptíveis, parcialmente resistentes e resistentes (26).

O bom desempenho do MMTT encontrado no presente estudo é compatível aos resultados obtidos por outros autores e também à avaliação multicêntrica realizada em

diferentes países da América Latina (Tabela 28). O desempenho geral do MMTT para os fármacos INH, RMP e EMB foi considerado alto, com exceção da estreptomicina (38).

**Tabela 28- Estudos de desempenho e valores sensibilidade e especificidade dos fármacos de primeira linha para o MMTT.**

ESTUDO	Nº de isolados	INH		RMP		EMB		SM	
		S	E	S	E	S	E	S	E
Montoro <i>et al</i> ,2005(36)	100	100	96,4	100	100	94,1	71,1	91,7	88,5
Martinet <i>et al</i> ,2005(38)	210	97,6	98,4	99	99	96,6	96,6	90,5	88,5
Palomino <i>et al</i> 2002(61)	80	96,2	100	100	100	—	—	—	—
Mengatto <i>et al</i> 2006(26)	64	96	100	100	100	87	96	95	93
Iglesia, <i>et al</i> , 2009 (64)	69	93,6	100	100	97,7	—	—	93,6	100

S: sensibilidade, E: especificidade

Nos últimos anos, o ensaio de nitrato redutase (NRA) tem sido proposto como uma alternativa para a detecção de resistência. Baseado na capacidade do *M.tuberculosis* em reduzir nitrato em nitrito, o método permite facilmente a visualização da resistência através de reação colorimétrica (65). Em dois recentes estudos, foi avaliado o uso do NRA diretamente no espécime clínico positivo e foram encontrados altos valores de sensibilidade e especificidade para INH e RMP (tabela 29) (66,67). O método colorimétrico de microdiluição em placa utilizando Alamar Blue® ou rezasurina (REMA) também tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade quando comparado ao método das proporções, sendo similar aos sais de tetrazolium,

tanto no desempenho quanto nos pontos de corte (34). Alguns autores têm proposto a realização deste método em tubos, e obtiveram altos valores de concordância para INH e RMP (65,68). A tabela 29 relata diversos estudos realizados com os métodos colorimétricos.

**Tabela 29. Estudos que utilizaram métodos colorimétricos para a detecção de resistência aos fármacos para *Mycobacterium tuberculosis***

Estudo	I.O	RMP		INH		SM		EM		PZA	
		S	E	S	E	S	E	S	E	S	E
Palomino <i>et al</i> (32)	AB	100	100	100	100	91,2	91,7	95,8	97,8	—	—
Palomino <i>et al</i> (61)	RZ	100	100	100	96,2	—	—	—	—	—	—
Martin <i>et al</i> (69)	RZ	—	—	—	—	—	—	—	—	100	98
Nateche <i>et al</i> (70)	RZ	100	99,2	100	98,3	—	—	—	—	—	—
Angeby <i>et al</i> (71)	NRA	100	100	97	96	95	83	75	98	—	—
Syre <i>et al</i> (72)	NRA*	—	—	—	—	73	100	64	92	—	—
Montoro <i>et al</i> (36)	NRA	100	100	95,6	96,4	93,7	98	100	98,7	—	—
Musa <i>et al</i> (66)	NRA	100	100	93	100	76	100	55	99	—	—
Solis <i>et al</i> (67)	NRA	93,5	100	99,1	100	—	—	—	—	—	—

S: sensibilidade E: especificidade I.O : indicador de oxiredução , AB : Alamar Blue®, RZ: resazurina, NRA: ensaio com nitrato redutase

\* desempenho do teste em comparação com Bactec 460®

### 5.5.2. Comparação dos métodos

Utilizou-se no presente estudo, como método de comparação o sistema automatizado Bactec MGIT 960®. Estudo multicêntrico demonstrou bom desempenho deste método e alta reprodutibilidade para teste de susceptibilidade as drogas de 1ª linha, exceto para SM, que apresentou uma baixa especificidade (73). Em estudo nacional, com a participação de três laboratórios de referência, foi observada alto desempenho do Bactec MGIT 960®, com valor inferior de especificidade para SM (94,4%). O tempo médio de detecção dos resultados (5 a 12 dias) para Bactec MGIT 960® é comparável ao tempo observado pelo MMTT (12 a 14 dias), com vantagem evidente de ambos em relação ao método das proporções (42 dias) (figura 6) (74). Os próximos passos para a padronização dos métodos colorimétricos com MTT e resazurina dependem de ensaios clínicos, fases III e IV, que comparem o desempenho e a custo efetividade com o método de referência.

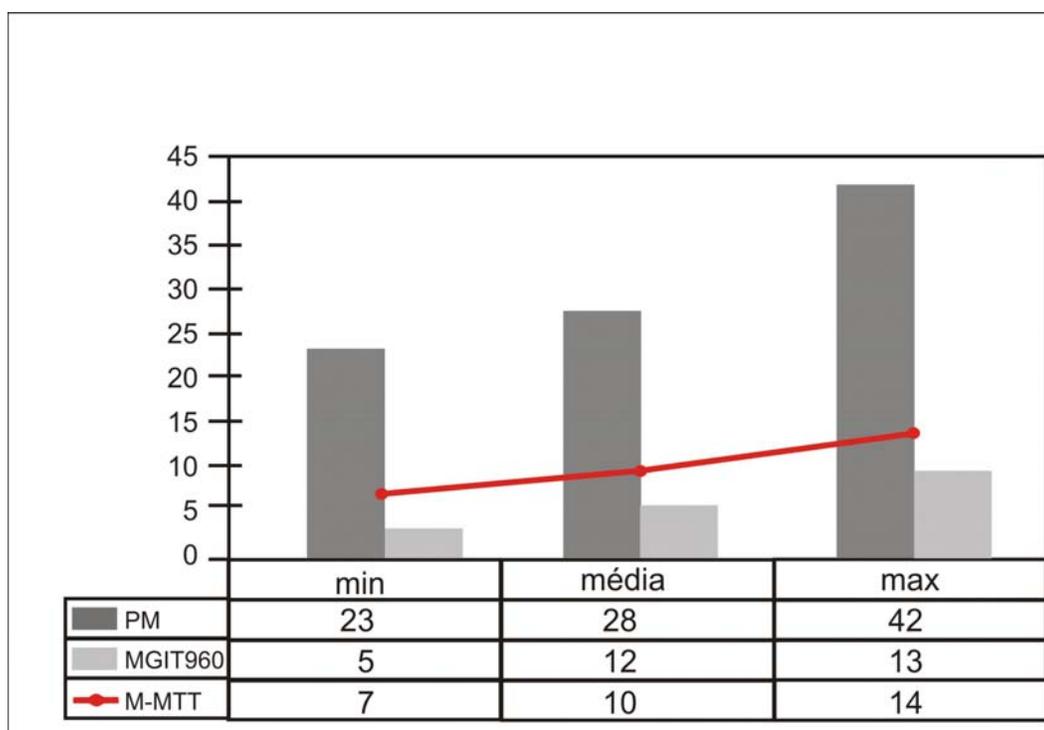
Estudo de custo efetividade para os métodos de susceptibilidade aos fármacos, incluindo o método MTT, “Fast Plaque-Response”, Inno-Lipa e método das proporções direto e indireto demonstrou que os métodos testados são custo efetivos para teste de multirresistência em países em desenvolvimento; incluindo os custos para a redução da transmissão. O MMTT teve o segundo menor custo por vida salva. (75).

A maior desvantagem do método Bactec MGIT 960®, se refere ao custo, o que impede a implementação na rotina em países com limitados recursos. O custo médio por cepa para dois e quatro fármacos é de U\$ 19,52 e U\$ 39,04, respectivamente. Para o MMTT, os custos se apresentam baixos, seguindo a média de U\$ 2,23 e U\$ 3,96/cepa para dois e quatro fármacos respectivamente (26). Relacionando-se o tempo para execução, a bom desempenho e os custos, o MMTT se apresenta como viável e de fácil aplicabilidade, não necessitando de equipamentos

específicos e de sofisticado treinamento operacional. Soma-se a estas vantagens a possibilidade da identificação das CIMs e determinação de graus de resistência.

Outros métodos fenotípicos como o Mods (observação microscópica de sensibilidade às drogas) e NRA (ensaio do nitrato redutase) apresentam baixo custo. O NRA, no formato padronizado atualmente apresenta resultados qualitativos (26). Para a utilização do Mods há a necessidade de profissionais experientes para a análise dos resultados além das questões relacionadas a biosegurança.

Os métodos genotípicos como o INNO-LiPA Rif-TB (Innogenetics) e o GenoType MTBDR (Hain Lifesciences), embora comercializados, de bom desempenho e de utilização direto do espécime clínico apresentam custos proibitivos para a utilização em situações de rotina (US\$ 64) (60).



PM- método das proporções; MGIT 960- Bactec MGIT960®;MMTT- método MTT

**Figura 6 – Comparação do tempo de obtenção dos resultados para o método das proporções, Bactec MGIT 960® e MMTT. Adaptado de Morcillo N, 2004 (76,74).**

### **5.5.3. Estabilidade dos fármacos para os testes de susceptibilidade.**

A baixa especificidade para SM e EMB foi relatada em diversos estudos para o MMTT, evidenciando a necessidade de aprimoramento da técnica. (36,38). Os fatores que influenciam a reprodutibilidade e interpretação dos testes de susceptibilidade são: a potência e a estabilidade dos fármacos, os critérios de resistência adotados, a homogeneidade e a concentração do inóculo, além da idade e pureza da cultura. (1,77,78).

Alguns fatores associados à ocorrência de resultados discordantes para SM e EMB para o método colorimétrico de diluição em placa tem sido citados na literatura. O reduzido número de cepas resistentes em uma população sensível, bem como a instabilidade e a conseqüente degradação dos fármacos em meio líquido têm sido apontadas como possíveis fatores desencadeantes de resultados errôneos (26,36). São consideradas condições catalisadoras do processo de degradação do fármaco: o calor, a presença de OH<sup>-</sup> no meio e a presença de luz. A instabilidade dos fármacos (SM e EMB) foi demonstrada em estudo, destacando a perda da metade da atividade farmacológica do EMB em quatro dias de incubação a 37°C e deterioração também foi observada para SM nesta mesma temperatura. (77,78).

Em termos gerais para os fármacos, um aumento de temperatura de 10°C pode produzir um aumento de duas a cinco vezes na degradação. A causa mais provável do processo de degradação, associada aos fatores catalisadores, é a solvólise, no qual moléculas do fármaco interagem com moléculas de água, gerando um produto de degradação de composição química diferente. (78).

Com vistas em preservar a estabilidade dos fármacos, e contribuir para adequação dos resultados, foram propostos no presente estudo a adição de quantidade reduzida de etanol para a solução mãe de cloridrato de etambutol e phenol para o sulfato de estreptomicina. O composto phenol em baixa concentração é utilizado como preservativo em preparações farmacêuticas injetáveis de estreptomicina. A tentativa de

utilização deste composto no presente estudo, na concentração utilizada não demonstrou interferência na estabilidade do fármaco, como pode ser observado na tabela 23. Cinquenta e três isolados apresentaram CIMs iguais para as soluções SM-a e SM-p, e em 45 a CIM para a segunda solução (SM-p) foi maior em relação à CIM do SM-a. Para os isolados resistentes não houve diferença significativa entre as faixas de CIMs. Desta forma a efetividade da mistura foi baixa e não contribuiu para a obtenção de resultados concordantes.

Em contrapartida, o uso do etanol se mostrou eficaz quando adicionado ao EMB. Embora o etanol a 70% seja tuberculostático (79,80), a concentração final na microplaca para o teste foi de 0,3%, considerada baixa se comparada às concentrações testadas e utilizadas como inativadoras do *M.tuberculosis*. Para 85 (71,4%) cepas as faixas das concentrações inibitórias mínimas foram menores para a solução do fármaco contendo etanol, o que indica uma ação positiva e possivelmente protetora deste composto em relação à estabilidade do fármaco (Tabela 21). Estes resultados apontam um caminho para a padronização e adequação do método para este fármaco. No entanto, há a necessidade de avaliação de um maior número de isolados resistentes.

A detecção de resistência a pirazinamida é de grande importância, por tratar-se de fármaco de escolha nos tratamentos iniciais, entretanto algumas condições dificultam a reprodutibilidade dos testes de susceptibilidade. Trata-se de um fármaco que atua potencialmente em pH ácido (pH 5.5) propriedade que dificulta sua avaliação *in vitro*. As CIMs devem ser de 10 a 20 vezes maiores do que as concentrações efetivas *in vivo* para os métodos disponíveis (69). Devido a estas limitações, neste estudo não foi possível a realização do MMTT para a pirazinamida. Martin *et al* (69), propuseram a utilização do método de microdiluição em placa com resazurina como uma eficaz alternativa, substituindo a pirazinamida por nicotinamida.

O método Bactec 460® apresenta bom desempenho para pirazinamida, sendo considerado referência pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards

(NCCLS). Recentemente o Bactec MGIT 960® tem sido utilizado para a detecção de resistência a pirazinamida (69).

#### **5.3.4. Concentração inibitória mínima dos diferentes fármacos e padronização dos pontos de corte.**

Neste estudo, os pontos de corte foram definidos de acordo com os valores reportados por Martin *et al* (38): 0,25 µg/mL para I; 0,5 µg/mL para RMP; 4 µg/mL para EMB, 1 µg/mL para SM. Para INH, a frequência do CIM para os isolados sensíveis foi para a menor concentração testada (0,015 µg/mL) e para os casos resistentes de 16µg/mL. Semelhante resultado foi observado para RMP, com uma tendência para menores CIMs para as cepas sensíveis, e para os isolados resistentes as CIMs foram maiores que 4 µg/ml, com predominância para 32 µg/mL, exceto para um discordante cujo valor foi 0,5 µg/mL, o que caracteriza fácil discriminação para resistência. Estes valores se apresentam concordantes quando comparados com valores reportados por Palomino *et al*, 2002 (61).

Para EMB, as CIMs para as cepas sensíveis foram adequadas e concordantes se comparadas aos resultados de Martin *et al* (38), destacando que os valores obtidos para a EMB-e permite uma perfeita separação entre os grupos sensível e resistente. Diferentemente dos resultados reportados por Montoro *et al*, 2005 (36), que encontrou elevado número de resultados discordantes para este fármaco, sendo que 24 isolados se apresentaram sensíveis pelo método das proporções e resistentes pelo MMTT, possivelmente devido a perda de potência do EMB, já descrita anteriormente. Alcaide e Sreevatsan (81,82) demonstraram que mutações no gene *emb B* estão associadas à resistência a altas concentrações, enquanto que isolados que apresentam um baixo nível de resistência (resistência parcial), não apresentam mutações neste gene.

No que se refere ao sulfato de estreptomicina prevalência das CIMs para os isolados sensíveis foi 0,06 µg/mL. Observou-se discordância em cinco isolados, quatro parcialmente resistentes e um resistente para o Bactec MGIT 960® e sensível para o MMTT, resultado semelhante aos relatados anteriormente em outros estudos, o que reforça a necessidade de melhor definição para o critério de classificação de resistência, principalmente em relação aos isolados parcialmente resistentes (26,36,38).

Critérios mais acurados de avaliação da resistência são necessários, especialmente para aqueles isolados que apresentam uma baixa resistência (valor próximo ao ponto de corte), que podem ser considerados como parcialmente resistentes. Neste sentido, os estudos multicêntricos com uma população maior podem contribuir para a definição mais objetiva destes critérios.

O presente estudo contribuiu para:

- conhecer a magnitude da resistência do *M. tuberculosis* num contexto hospitalar;
- demonstrar a utilidade do MMTT e a sua aplicabilidade em situações de rotina, em especial em laboratórios com infra-estrutura e recursos limitados;
- testar os pontos de corte para os fármacos pelo MMTT;
- avaliar alternativas de estabilização dos fármacos como, por exemplo, a adição de etanol ao EMB com vistas ao aprimoramento do MMTT na avaliação de susceptibilidade do *M.tuberculosis*.

Como a pesquisa foi desenvolvida em um hospital terciário, os resultados não podem ser generalizados para outros locais, além disto, o pequeno número de pacientes que apresentaram resistência limitou a análise de fatores associados à resistência e ao desfecho clínico.

Limitações referentes ao método, como a impossibilidade de testar a susceptibilidade das cepas para PZA e o reduzido número de isolados resistentes ao EMB não permitiram a completa avaliação do método MTT.

## ***6. CONCLUSÃO***

- A prevalência de resistência entre os casos novos atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp no período de estudo foi de 3,8% para isoniazida, 1% para rifampicina, 3,8% para estreptomicina e 1% a isoniazida e rifampicina. Resistência a qualquer fármaco foi observada em 6,7% dos casos.
  
- O método de microdiluição em placa com tetrazolium apresentou bom desempenho, com sensibilidade e especificidade para as diversos fármacos, respectivamente, de:
  - 100% e 100% para a INH;
  - 90% e 100% para a RMF;
  - 100% e 100% para o EMB;
  - 90,9% e 100% para a SM.
  
- O método de microdiluição em placa apresentou os seguintes valores preditivos positivos e negativos para os diversos fármacos respectivamente:
  - 100% e 100% para INH;
  - 100% e 99% para RMP;
  - 100% e 100% para EMB
  - 100% e 99,1% para SM
  
- Evolução favorável ocorreu em 67(63,8%) casos, óbito em 26 (24,8%) e abandono em doze (11,4%) casos. Dos sete pacientes com drogarresistência: três curaram, dois evoluíram para óbito e dois perderam o seguimento. O paciente com tuberculose multidrogarresistente curou no 18º mês de tratamento. Houve maior evolução para a cura entre os pacientes que apresentaram isolados susceptíveis a todos os fármacos, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo resistente e o sensível ( $p=0,69$ ), relacionada possivelmente ao pequeno número de casos resistentes.

## ***7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

1. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the TLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994–1997. Geneva, Switzerland: (WHO/TB/97.229). 1997.
2. World Health Organization. WHO report 2009: global tuberculosis control epidemiology, strategy, financing. Geneva, Switzerland: (WHO/HTM/TB/2009.411). 2009
3. World Health Organization. TDR news. Special programme for research & training in tropical diseases sponsored by Unicef /UNDP/ World Bank/WHO. Geneva, Switzerland: 81.2008.
4. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO / IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 2002- 2007 Geneva, Switzerland: (WHO/HTM/TB/2008.394).2008.
5. World Health Organization. Tuberculosis facts. Geneva, Switzerland: WHO april 2008. Disponível em: [www.who.int/tb](http://www.who.int/tb). [Acesso em 01/07/2009].
6. Galesi V. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof Alexandre Vranjac. Divisão de Controle da Tuberculose. Tuberculose indicadores epidemiológicos e operacionais. 2008. Disponível em: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/tb/2008/VGalesi\\_TBind.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/2008/VGalesi_TBind.pdf) . [Acesso em 26/06/2009].

7. Brasil. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. Programa nacional de controle da tuberculose. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Disponível em:  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_tecnica\\_versao\\_28\\_de\\_agosto\\_v\\_5.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf).
8. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof Alexandre Vranjac. Divisão de Controle da Tuberculose. Fórum Estadual de Tuberculose. Disponível em:  
[www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/TB/tb\\_num/tub\\_sp.pps](http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/TB/tb_num/tub_sp.pps). [Acesso em 10/10/2006]
9. Silva Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA, Giampaglia CMS, Martins MC, Euki SY et al. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in a urban community. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; 9(9):970-976.
10. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof Alexandre Vranjac. Tuberculose no Estado de São Paulo. Indicadores de Morbimortalidade e Indicadores de Desempenho. *Boletim Epidemiológico Paulista*, São Paulo, v 3, S 4, p. 1-37, set 2006.
11. Brito RCGC, Lima DB, Siqueira H, Cavalcanti HR, Pereira MM, Kritski AL. Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. *J Pneumol*. 2004; 30(4):335-42.
12. Kritski AL, Lapa ES, Conde MB. Tuberculosis and HIV: Renewed Challenge. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1998; 93(3): 417-22.

13. Snider Jr DE & Dooley SW. Nosocomial Tuberculosis in the AIDS era with an emphasis on multidrug-resistant disease. *Heart Lung*.1993; 22(4): 365-9.
14. Resende MR, Villares MC; Ramos MC. Transmission of tuberculosis among patients with human immunodeficiency virus at a University Hospital in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*.2004; 25(12): 1115-7.
15. Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos GL, Poblete RB, Moreno JN, Reyes RR *et al*. An outbreak of Tuberculosis caused by multiple-drug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann Intern Med*.1992; 117(3): 177-83.
16. Centers for Disease Control. Nosocomial transmission of multidrug resistant Tuberculosis among HIV infected persons Florida and New York, 1988 a 1991. *MMWR*.1991; 40(34): 585-91.
17. Cauthen GM, Dooley SW, Onorato IM, Ihle WW, Burr JM, Bigler WJ *et al*. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from tuberculosis patients with HIV infection or AIDS. *Am J Epidemiol*, 1996; 144(1): 69-77.
18. Moro ML, Gori A, Errante I, Infuso A, Franzetti F, Sodano L *et al*. Italian multidrug-resistant tuberculosis outbreak study group - An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy. Italian Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak Study Group. *AIDS*.1998; 12(9):1095-102.
19. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof Alexandre Vranjac. Diário oficial do estado de São Paulo. Poder executivo: seção 1, São Paulo; 116(53):15.

20. Rossetti MLR, Valim ARM, Silva MSN, Rodrigues VS. Resistant tuberculosis: a molecular review. *Rev Saúde Pública*.2002;36(4):525-32.
21. Miller, LP, Crawford JT, Shinnick FM. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1994; 38:805-11.
22. Willians DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, et al. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38(10):2380-6
23. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer k, Williams D, Kreiswirth B, Musser JM. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographical localities. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(4):1024-6.
24. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem*.2001; 47(5):809-14.
25. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis*.1998; 79(1): 3-29.
26. Mengatto L, Chiani Y, Imaz MA. Evaluation of rapid alternative methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.2006; 101(5): 535- 42.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. 2005,3ed.

28. Drobniewski FA, Craws M, Gibson A, Yong D. Modern laboratory of tuberculosis. *Lancet Infect Dis.*2003; 3:141-7.
29. Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J.*2005; 26(2):339-50.
30. Ivens-de-Araujo M.E, Fandinho FC, Werneck-Barreto AM, Gonçalves-Veloso V, Grinstejn B, Lourenço MK *et al.* DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with and without AIDS in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res.* 1998 31(3):369-72.
31. Franzblau SG, Witzig RS, Mcclaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A *et al.* Rapid, low-technology CMI determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. *J Clin Microbiol.*1998; 36(2): 362-3.
32. Palomino JC, Portaels F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*1999;18(5):380-3.
33. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.*2002; 40(5):1873- 4.
34. Osório MR, Gomes Silva da M, Senna GS, Rossetti ML, Fonseca S.L. Evaluation of rapid microplate assays using cellular-viability indicators to determine patterns of susceptibility of isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Bras Pneumol.*2004,30 (4):455-60.

35. World Health Organization. Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potencial. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2006.
36. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test , and the rezasurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother.2005; 55(4):500-5.
37. Giampaglia CMS, Martins MC, Inumaru VTG, Butuem IV, Telles MAS. Evaluation of a rapid differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with nitrobenzoic acid and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. Int J Tuberc Lung Dis.2005; 9(2):206–9.
38. Martin A, N Morcillo, Lemus D, Montoro E, Silva Telles da MA, Simboli N *et al*. Multicenter study of MTT and rezasurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs.Int J Tuberc Lung Dis.2005; 9(8):901–6.
39. Balows A,Hausler JW, Herrmann LK, Isenberg DH, Shadowmy JH. Manual of clinical microbiology. 5th ed.Washington: American society for microbiology; 2005.p.1259.
40. Becton Dickison & Co. BD Bactec MGIT 960 sire kits for the antimycobacterial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*.2004
41. Ardito F, Posteraro B, Sanguinetti M, Zanetti S, Fadda G. Evaluation of Bactec Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbio.2001; 39(4): 4440-4.

42. Fandinho FCO, Kritski AL, Hofer C, Conde Jr H, Ferreira RMC, Silva MG *et al.* Drug resistance patterns among hospitalized tuberculous patients in Rio de Janeiro, Brazil, 1993-1994. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(4): 543-7.
43. Aguiar F, Vieira MA, Staviack A, Buarque C, Marsico A, Fonseca L *et al.* Prevalence of anti-tuberculosis drug resistance in a HIV/AIDS reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13(1): 54-61.
44. Pablos-Méndez A, Raviglione M, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Buestro F, Cohn DL *et al.* Global surveillance for antituberculosis-drugs resistance, 1994-1997. *N Engl J Med* 1998; 338(23): 1641-9.
45. De C Ramos M, Vilares MCB, Jacques DM, Calusni ALR, Roscani GC, Alves EP. Estudo Bacteriológico Retrospectivo das Infecções Micobacterianas em Pacientes Portadores da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (Sida). *Brazilian Journal of Infectious Diseases*.2000; 4(2): 86-90.
46. Pinto WP, Hadad DJ, Silva Telles MA, Ueki SY, Palaci M, Basile MA. Tuberculosis and drug resistance among patients seen at an AIDS Reference Center in Sao Paulo, Brazil. *Int J Infect Dis*.2001; 5(2): 93-100.
47. Souza de BM, Antunes FMC, Garcia FG. Perfil de sensibilidade e fatores associados à resistência do *Mycobacterium tuberculosis*, em centro de referência de doenças infecto-contagiosas de Minas Gerais. *J bras pneumol*. 2006; 32(5): 430-7.
48. Lemos GRR. Estudo dos casos de tuberculose com resistência às drogas antituberculose no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, 1998- 2004 [dissertação]. São Paulo-SP: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde de São Paulo; 2007.

49. Liaw YS, Hsueh PR, Yu CJ, Wang SK, Luh KT. Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in a hospital in Taiwan, 1998-2002. *J Formos Med assoc.*2004; 103(9): 671-7.
50. Senol G, Komurcuoglu B, Komurcuoglu A. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in western Turkey: a retrospective study from 1100-bed teaching hospital. *J Infect* 2005; 50(4): 306–11.
51. Harrow E M, Rangel J M, Arriega J M *et al.* Epidemiology and clinical consequences of drug-resistant tuberculosis in a Guatemalan hospital. *Chest* 1998; 113(6): 1452–8.
52. Lee J H, Chang J H. Drug-resistant tuberculosis in a tertiary referral teaching hospital of Korea. *Korean J Intern Med.* 2001; 16(3): 173–9.
53. Melo FAF, Afiune JB, Ide Neto J, Almeida de EA, Spada DTA, Antelmo ANL *et al.* Aspectos epidemiológicos da tuberculose multiresistente em um serviço de referência da cidade de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(1): 27-34.
54. Albuquerque de MF, Leitão Sá de CC, Campelo LRA, Souza de VW, Salustiano A. Fatores prognósticos para o desfecho do tratamento da tuberculose pulmonar em Recife, Pernambuco, Brasil. *Pan AM J Public Health.*2001; 9(6): 368-74.
55. Siqueira de RH, Freitas de DA, Oliveira de ND, Barreto WMA, Dalcomo PM, Albano MR. Clinical evolution of a group of patients with multidrug-resistant TB treated at a referral Center in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Pneumol.*2009; 35(1): 54-62.

56. Espinal AM, Kim JS, Suarez GP, Kai MKMB, Khomenko GA, Migliori MD *et al.* Standart short-course chemotherapy for drug-resistant Tuberculosis. Treatment outcomes in 6 countries. *Jama*.2000; 283(19): 2537-45.
57. Medeiros RFM, Melo JB, Caldas PCS, Santos LM, Barreto AMW. Utilização de agentes inibidores (PNB e TCH) para identificação de *M.tuberculosis* no sistema MB Bact. Um estudo preliminar. *Laes & Haes*.2001;131: 202-4.
58. Giampaglia CMS, Martins MC, Chimara E, Oliveira RS, Vieira Oliveira de GB, Marsico AG *et al.* Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria with p-nitrobenzoic acid using MGIT 960. *Int J Tuberc Lung Dis*.2007; 11(7):803-7.
59. Rastogi N, Goh K S, David H I. Selective inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by -nitro-acetylamino-hidroxypropriophenona (NAP) and nitrobenzoic acid (PNB) used in 7H11 agar medium. *Res Microbiol* 1989; 140: 419–23.
60. Guillerm M, Usdin M, Arkininstall J. Tuberculosis diagnosis and drug sensitivity testing. An overview of the current diagnostic pipeline. Paris: *Medicins sans frontier*; 2006.35p
61. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother*.2002; 46 (8): 2720-2.
62. Heifets LB, Lindholm-Levy PJ, Flory M. Bactericidal activity in vitro of various rifamycins against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis*.1990; 141(3): 626-630.

63. Luna-Herrera J, Martinez-Cabrera G, Parra-Maldonado R, Enciso-Moreno JA, Torres-Lopez J, Quesada-Pascual F *et al.* Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22(1): 21-7.
64. Iglesia la de IA, Stella JE, Morbidoni RH. Comparison of the performances of two in-house methods for antitubercular drug susceptibility testing *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(2): 808-10.
65. Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods. *J Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13(8): 754-762.
66. Musa HR, Ambroggi M, Souto A, Angeby KA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy-positive sputum samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3159–61.
67. Solis LA, Shin SS, Han LL, Llanos F, Stowell M, Sloutsky A. Validation of a rapid method for detection of *M. tuberculosis* resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9(7): 760–764.
68. Coban AY, Cekic Cihan C, Bilgin K, Uzun M, Akgunes A, Cetinkaya E *et al.* Rapid susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin with resazurin method in screw-cap tubes. *J Chemother* 2006; 18(2): 140–3.
69. Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings J, Palomino JC, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(2):327–31.

70. Nateche F, Martin A, Baraka S, Palomino JC, Khaled S, Portaels F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *J Med Microbiol.* 2006; 55(7): 857–860.
71. Angeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2):553–5.
72. Syre H, Valvatne H, Sandven P, Grewal HM. Evaluation of the nitrate-based colorimetric method for testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to streptomycin and ethambutol in liquid cultures. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(5): 987–91.
73. Bemer P, Palicova F, Gerdes RS, Drugeon BH, Phyffer EG. Multicenter evaluation of fully automated Bactec Mycobacteria growth indicator tube 960 System for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.*2002; 40(1): 150-4.
74. Giampaglia CMS, Martins MC, Vieira OGB, Vinhas SA, Silva Telles MA, Palaci M *et al.* Multicenter evaluation of an automated Bactec 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11(9): 986- 91.
75. Villaorduna-Acuna, Vassall A, Henostroza G, Seas C, Guerra H, Vasquez L *et al.* Cost-effectiveness analysis of introduction of rapid alternative methods to identify multidrug resistant tuberculosis in middle- income countries. *Clin Infect Dis.*2008; 47(4):487-95

76. Morcillo N. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a home made microdilution colorimetric based method. In: I encontro nacional de tuberculose; 2004; Brasília. Disponível em: [http://www.sbpt.org.br/downloads/arquivos/NORA\\_MORCILLO\\_Brasilia.pdf](http://www.sbpt.org.br/downloads/arquivos/NORA_MORCILLO_Brasilia.pdf). [Acesso em: 18/07/2009].
77. Griffith ME, Bodily LH. Stability of antimycobacterial drugs in susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 1992; 36(11): 2398-402.
78. Aulton E M. Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed editora S.A; 2005. 140-2 p.
79. Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(10): 2234- 9.
80. Williams DL, Gillis TP, Dupree WG. Ethanol fixation of sputum sediments for DNA-based detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(6): 1558-61.
81. Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of *emb B* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(10): 2270-3.
82. Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(8): 1677- 81.
83. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid Identification of *mycobacteria* to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31 (2): 175-8.

## ***8. ANEXOS***

## ANEXO1

### MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS UTILIZADOS

#### **1.1 Baciloscopia e descontaminação (Método de Petroff)**

Inicialmente foram confeccionadas lâminas e coradas com coloração de Ziehl-Neelsen. Os espécimes não estéreis foram descontaminados pelo método de Petroff descrito a seguir. A amostra clínica foi colocada em tubo cônico plástico, onde foi adicionada quantidade similar de solução hidróxido de sódio a 4% com vermelho fenol, obtendo-se a coloração rósea. Após homogeneização, os tubos foram levados à estufa 37°C por 20 minutos e centrifugados a 2000rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento titulado com solução de ácido clorídrico 2 N até a viragem do indicador vermelho de fenol para a cor amarela. A seguir, procedeu-se a neutralização do material com hidróxido de sódio a 0,4%, obtendo-se novamente a coloração rósea. O ph foi ajustado para 7,0 (24).

#### **1.2 Detecção pelo MB Bact®**

Realizou-se a inoculação de 0,5 mL do material em frasco específico de procedimento MB/Bact contendo o meio 7H9, com a informação apropriada do paciente. Antes da inoculação, foi adicionado 0,5mL de suplemento antibiótico utilizando-se seringa e agulha. Todos os frascos foram devidamente desinfetados com compressa de álcool 70°GL antes e após o procedimento. Cada amostra de paciente processada foi recolhida e inoculada nos frascos MB/Bact utilizando-se seringa de tuberculina, sendo estes então inseridos no aparelho MB/Bact. As planilhas dos pacientes foram registradas no sistema do aparelho e os frascos permaneceram no aparelho durante quarenta e dois dias, ou até

indicação de um resultado positivo. Os frascos cuja indicação através do aparelho foram positivas foram testados novamente através de esfregaço e corados pelo método Zihel-Neelsen. Uma alíquota do frasco MB/Bact foi retirada e adicionada ao meio Löwenstein Jensen para nova cultura. Para as amostras estéreis os mesmos procedimentos iniciais de coloração e inoculação foram utilizados e as mesmas não passaram pelo processo de descontaminação anteriormente descrito (27).

### **1.3.- Identificação dos isolados – “PCR RESTRICTION ENZYME ANALYSIS (PRA-*hsp65*)”**

As cepas foram submetidas à identificação molecular por PRA-*hsp65*, seguindo o protocolo padronizado por Telenti *et al*, 1993 (83).

Para a extração do DNA genômico foram retiradas células bacterianas do meio sólido Löwenstein Jensen, e suspensas em Tampão TE (Tris-HCl ph 8.3, 1 mM EDTA) adicionado de 1% Triton X-100. As células foram inativadas a 100°C por 10 minutos e posteriormente congeladas a -20°C durante a noite. As condições para a amplificação do fragmento do gene *hsp65* são descritas na tabela 30.

Após a amplificação, foi realizado a digestão de parte do produto com a enzima *BstEII* a 60°C, por 90 minutos, e outra parte com a enzima *HaeIII* (Invitrogen) a 37°C, por 60 minutos. Todos os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 4% a 100V por 90 minutos e corados pelo brometo de etídio.

**Tabela 30. Condições de PCR utilizada para amplificar o fragmento do gene *hsp65*.**

---

<b>INICIADORES</b>	<b>Tb11 5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3'</b>
	Tb12 5' CTTGTCGAACCGCATACCCT 3'
<b>REAÇÃO</b>	KCl 50mM
	Tris-HCl 10mM pH8
	MgCl <sub>2</sub> 1,5mM
	dNTPs 200µM
	Glicerol 10%
	iniciadores 0,5µM
	Taq DNA Polimerase 1U
<b>AMPLIFICAÇÃO</b>	1 ciclo    94 <sup>0</sup> C    5 min
	45 ciclos    94 <sup>0</sup> C    1 min
	65 <sup>0</sup> C    1 min
	72 <sup>0</sup> C    1 min
	1 ciclo    72 <sup>0</sup> C    10 min
<b>ELETROFORESE</b>	agarose 4%    100V
<b>PRODUTO</b>	441pb

---

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da pesquisa:** Resistência aos fármacos antimicobacterianos em um hospital terciário: utilidade do “Método de microdiluição em placa com sal de Tetrazolium” MTT  
**Pesquisadoras:** **Michela Ferrari, Profa Dra. Mariângela Ribeiro Resende e Profa Dra. Maria Luiza Moretti**

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) desta pesquisa que tem por finalidade determinar a prevalência de resistência aos medicamentos mais freqüentemente utilizados no tratamento da tuberculose (isoniazida, rifampicina, etambutol e estreptomicina) entre os casos novos de tuberculose atendidos no Hospital De Clínicas da Unicamp, através dos métodos MGIT 960® e teste colorimétrico de microdiluição em placa com [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide].

O estudo não implicará em riscos diretos *ao Sr.(a)*, uma vez que os procedimentos aos quais será submetido constituem instrumentos normatizados para o diagnóstico laboratorial da tuberculose, os novos testes diagnósticos serão realizados em paralelo àqueles previamente padronizados. Os pesquisadores se comprometem a manter os dados de identificação do *Sr.(a)*, em sigilo, além de comunicá-lo a cerca de qualquer dado relevante que represente risco ou benefício à sua saúde.

O Sr.(a) tem liberdade de se recusar a participar, e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o sr.(a). Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

Ao participar desta pesquisa o Sr.(a) não terá nenhuma despesa bem como nada será pago para sua participação. Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

## **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

---

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da pesquisa

---

Assinatura da pesquisadora

---

Assinatura da Orientadora

**TELEFONES: Michela Ferrari:**

**Profa Dra Mariângela R. Resende :**

Comitê de ética :

**ANEXO 3. FICHA DE NOTIFICAÇÃO TUBERCULOSE**

<b>Ficha de Notificação de TUBERCULOSE(TB-WEB-CVE-SP)</b> adaptada para uso NVE-HC-UNICAMP-Campinas em 12/2007			
<b>IDENTIFICAÇÃO</b>			
Número-SINAN _____		Data de notificação    /    /                      Fl nº _____	
Nome _____			Número Prontuário _____
Data Nasc. ____/____/____ Idade _____	!__! Sexo 1- Masc 2- Fem	Escolaridade (anos concluídos) _____	!__! Raça 1-Branca 2-Preta 3 - Amarelo 4-Pardo 5-Índigena 9- Ign
Mãe _____			
Ocupação _____		!__!Tipo de ocupação    1- Prof.Saúde 2-Prof.Sist.Penitenciário 3-Desempregado 4-Aposentado 5-Dona de Casa 6- Detento 7- Outros	
CEP _____	Telefone (    ) _____		
UF _____	Município _____	UBS - _____	
Rua/Av _____	Bairro _____		
<b>TRATAMENTO</b> Unidade notificante <input type="checkbox"/> HC-UNICAMP(2079798) <input type="checkbox"/> Outros			
!__! Tratamento anterior 1- Não tratou 2- Sim, alta cura 3- Sim, alta abandono 4- Não sabe 9- Sem informações Se Sim, tratou há _____ anos(completos)		!__! Forma Clínica 01 - Pulmonar                      08 - Intestinal 02 -                                      09 - Oftálmica 03 - Meningite                      10 - Meningite 04 - Pleural                          11 - Pele 05 - Ganglionar perif.              12 - 06 - Óssea                              13 - Laringe 07 - Vias Urinárias                  14 -	
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
!__! Tipo de Descoberta Data início dos sintomas ____/____/____  Especialidade responsável pelo tratamento _____		1 - Apresentação espontânea com sint. respiratório 2 - Apresentação espontânea outros motivos 3 - Encaminhamento com Suspeita ou Diag.de TB 4 - Controle de comunicantes 5 - Diag. após o óbito	
Local de Descoberta TB    !__! 05-PS ou Hosp universitário (HC-UNICAMP)    !__! Outros			
<b>EXAMES COMPLEMENTARES PARA DIAGNÓSTICO</b>			
<b>Bacteriologia</b> 1- POS 2- NEG 3- EM ANDAMENTO 8 - NÃO REALIZADO 9 - S/INFORMAÇÕES		<b>Outros Exames</b>	
!__! Baciloscopia de escarro !__! Baciloscopia de outro material !__! Cultura de escarro !__! Cultura de outro material		!__! R X do Torax                      !__! RX outro !__! Histopatológico _____ !__! Necrópsia _____ !__! Outro _____ !__! HIV - coleta em ____/____/____ !__! Teste tuberculínico em ____/____/____ Res _____ mm	
<b>Doenças associadas:</b> !__! 1 - Aids                      !__! 4 - Doença Mental !__! 2 - Diabetes                !__! 6 - Nenhuma !__! 3 - Alcoolismo              !__! 9 - Ignorado		<b>Códigos RX:</b> 1 - Normal 2 - Suspeita de TB 3 - Suspeita de TB com caverna 4 - Outras afecções 8 - Não realizado 9 - Sem informações	<b>Códigos Histopatologia e Necro:</b> 1 - Sugestivo de TB 2 - Não sugestivo de TB 8 - Não realizado 9 - Sem informação
Data início tratamento ____/____/____	!__! Rifampicina (R)	!__! Etambutol(E)	!__! Ofloxacin(OFL)
Peso _____	!__! Isoniazid(H)	!__! Estreptomicina(S)	!__! Terizidona(T)
	!__! Pirazinamida(Z)	!__! Etionamida(Et)	!__! Amicacina(A)
<b>COMUNICANTES</b> !__! - N° de contatos domiciliares(crianças<15 anos ____ )    !__! N° contatos examinados    !__! Contatos com TB			
!__! INTERNAÇÃO HOSPITALAR - HC - UNICAMP                      1- Sim 2 - Não			
Data internação ____/____/____	Data alta ____/____/____	Isolamento 1-Sim 2- Não	Motivo da Internação / HD
____/____/____	____/____/____		
Digitado TB- WEB em ____/____/____			

## Ficha de Notificação de TUBERCULOSE(TB-WEB-CVE-SP)

adaptada para uso NVE-HC-UNICAMP-Campinas em 12/2007

Informações complementares para uso interno do NVE-HC-UNICAMP- verso da ficha de TB  
 Sintomas  Tosse  Febre  Emagrecimento  Hemoptise  Infadenomegalia

Outro Sintoma \_\_\_\_\_

TB anterior Tratamento-início \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Fim \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Motivo  Cura  Abandono

Contato domiciliar e/ou frequente com TB \_\_\_\_\_

### Doenças e Fatores associados à TB (assinalar com X):

- 0 - Nenhuma  
 1 - AIDS HIV + em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 último Cd4 em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado \_\_\_\_\_ cel/mm<sup>3</sup>  
 2 - Etilismo ativo (ou há menos de 2 anos sem beber)  
 3 - Drogadição ativa (ou há menos de 2 anos sem usar)  
 4 - Doença Mental \_\_\_\_\_  
 5 - Institucionalização  atual  prévia  
 Tipo \_\_\_\_\_  
 6 - Diabetes  dieta  hipog oral  insulina  
 7 - Pneumopatia crônica \_\_\_\_\_  
 8 - Dç auto-imune \_\_\_\_\_  
 9 - Pbmicose \_\_\_\_\_  
 10 - Neoplasia \_\_\_\_\_  
 11 - TX de órgãos \_\_\_\_\_  
 12 - TMO \_\_\_\_\_  
 13 - Tto imunossupressor \_\_\_\_\_  
 14 - l.renal Crônica \_\_\_\_\_  
 15 - Hepatopatia \_\_\_\_\_  
 16 - Outras \_\_\_\_\_

### RX de tórax ou outro exame de imagem

- 1 - Cavitação - local \_\_\_\_\_  
 2 - Infiltrado apical \_\_\_\_\_  
 3 - Infiltrado miliar \_\_\_\_\_  
 4 - Infiltrado de campo médio ou base \_\_\_\_\_  
 5 - Infiltrado intersticial \_\_\_\_\_  
 6 - Linfadenomegalia hiliar \_\_\_\_\_  
 7 - Derrame pleural ou espessamento pleural \_\_\_\_\_  
 8 - Nódulos \_\_\_\_\_  
 9 - Outros \_\_\_\_\_

### TB meningea ou serosa (pleural, peritoneal ou pericárdica):

Coleta \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 1-Pleural  2-Peritoneal  3-Pericárdio  4-LCR  
 Resultado: Hemáceas \_\_\_\_\_  
 Leucócitos \_\_\_\_\_ (Neut \_\_\_% Linfomono \_\_\_%)  
 Prot \_\_\_\_\_ ADA \_\_\_\_\_  
 Glic \_\_\_\_\_ LDH \_\_\_\_\_

## EXAMES DE INVESTIGAÇÃO E CONTROLE HC/PM \_\_\_\_\_

Coleta	Data	BAAR	Cultura	Identificação e Sencibilidade
___/___/___	___/___/___			Solicitação ao LPC em ___/___/___
___/___/___	___/___/___			Coleta em ___/___/___ Material _____
___/___/___	___/___/___			Identificação _____
___/___/___	___/___/___			Perfil de sensibilidade - nº IAL _____
___/___/___	___/___/___			<input type="checkbox"/> Isoniazida <input type="checkbox"/> Etambutol
___/___/___	___/___/___			<input type="checkbox"/> Rifampicina <input type="checkbox"/> Estreptomina
___/___/___	___/___/___			<input type="checkbox"/> Pirazinamida
___/___/___	___/___/___			
___/___/___	___/___/___			
___/___/___	___/___/___			

DOTS solicitado por FAX à VE/UBS em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Tipo de tratamento  1- Auto-administrado  2-Supervisionado  3-Ign

**Encerramento de tratamento em** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Situação Tratamento	3ºmês	6ºmês	9ºmês	12ºmês	15ºmês	Encerramento

1-Cura 2- Abandono 3- Transf intraestadual 4 - Mudança de diagnóstico  
 5 -Óbito por TB 6 - Óbito não TB 7 - em tratamento ambulatorial 8- em tratamento internado 9 - Falência  
 10 -Outra 11- Faltoso 12 - Transferência para outro estado \_\_\_\_\_ 13 - Sem informações

Digitado TB- WEB em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**ANEXO 4**  
**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 05/07/06.  
(Grupo III)

**PARECER PROJETO:** Nº 254/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0187.0.146.000-06

### **I-IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO:** “TUBERCULOSE MULTIDROG-RESISTENTE NA REGIÃO DE CAMPINAS - USO DE TESTES MOLECULARES DE DETECÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA NO DIAGNÓSTICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Michella De Luca Ferrari

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 06/06/2006

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 25/07/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### **II - OBJETIVOS**

Estimar a prevalência de tuberculose resistente à droga de primeira linha, entre pacientes atendidos no HC/UNICAMP; Estimar a performance dos testes de detecção rápida de resistência isoniazida e rifampicina em pacientes co-infectados ou não pelo HIV.

### **III - SUMÁRIO**

Trata-se de estudo transversal com pacientes diagnosticados com TB no HC/UNICAMP subdivididos em três grupos. Serão excluídos os pacientes cujos dados clínicos não estejam disponíveis para análise.

### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Esta pesquisa apresenta uma metodologia adequada, a qual contribuirá para o desenvolvimento da área. A pesquisadora solicitou a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, porém julgamos que seja necessário.

### **V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII - DATA DA REUNIÃO

Aprovado “ad referendum” em 05 de julho de 2006.

A ser homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de julho de 2006.

  
**Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

CEP, 28/11/06.  
(PARECER PROJETO: Nº 254/2006)

## PARECER

### I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “TUBERCULOSE MULTIDROG-RESISTENTE NA REGIÃO DE CAMPINAS - USO DE TESTES MOLECULARES DE DETECÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA NO DIAGNÓSTICO E EVOLUÇÃO CLÍNICA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Michella De Luca Ferrari

### II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Emenda que altera o título para “UTILIDADE DO MÉTODO COLORIMÉTRICO DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA COM SAIS TETRAZOLIM NA DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTIMICROBIANAS ENTRE PACIENTES ATENDIDOS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE CAMPINAS”, reduz o número de sujeitos para 100, substitui pelo método automatizado Bactec MGIT para avaliação das novas técnicas, substitui pelo sal tetrazolim para a realização do teste colorimétrico de microdiluição em placa, a inclusão das drogas de primeira linha: estreptomicina e etambutol na detecção de resistência às drogas, bem como do método Inno Lipa, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de novembro de 2006.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
[cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

Página 1 de 1

**ANEXO 5**

**MUNICÍPIOS COMPONENTES DA DIREÇÃO REGIONAL DE SAÚDE XII DO ESTADO DE SÃO PAULO**

- Águas de Lindóia	- Louveira
- Americana	- Monte Alegre do Sul
- Amparo	- Monte Mor
- Artur Nogueira	- Morungaba
- Atibaia	- Nazaré Paulista
- Bom Jesus dos Perdões	- Nova Odessa
- Bragança Paulista	- Paulínia
- Cabreúva	- Pedra Bela
- Campo Limpo Paulista	- Pedreira
- Campinas	- Pinhalzinho
- Cosmópolis	- Piracaia
- Holambra	- Santo Antônio de Posse
- Hortolândia	- Santa Bárbara D'Oeste
- Indaiatuba	- Serra Negra
- Itupeva	- Socorro
- Itatiba	- Sumaré
- Jaguariúna	- Tuiuti
- Jarinu	- Valinhos
- Joanópolis	- Vargem
- Jundiaí	- Várzea Paulista
- Lindóia	- Vinhedo

**Fonte: Direção Regional de Saúde XI**

## ANEXO 6

Manuscrito Submetido à publicação in “Brazilian Journal of Medical and Biological Research .”

SUSCEPTIBILITY OF *M. TUBERCULOSIS* TO FIRST-LINE ANTIMYCOBACTERIAL AGENTS IN A BRAZILIAN HOSPITAL: ASSESSING THE UTILITY OF THE TETRAZOLIUM (MTT) MICROPLATE ASSAY.

Michela de Luca Ferrari<sup>1</sup>; Maria Alice da Silva Telles<sup>4</sup>, Lucilaine Ferrazoli<sup>4</sup>, Carlos Emílio Levy<sup>3</sup>; Maria Cecília Barison Villares<sup>3</sup>; Maria Luiza Moretti<sup>1, 2</sup>; Mariângela Ribeiro Resende.<sup>1,2</sup>

1. Disciplina de Doenças Infecciosas, Departamento de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas. 2. Seção de Epidemiologia Hospitalar, Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. 3. Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. 4. Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

**Correspondent author:** Mariângela Ribeiro Resende

Departamento de Clínica Médica: Rua Alexander Fleming, 40, Postal Box 6111, Campinas, São Paulo, Brazil, Zip code: 13083-970; telephone number: 55 19 35217178, fax number 55 19 3521 7451; e-mail: [mresende@hc.unicamp.br](mailto:mresende@hc.unicamp.br)

**Running Title:** Susceptibility test with tetrazolium for tuberculosis

**Key words:** Tuberculosis; resistance; Drug susceptibility test; Tetrazolium; Colorimetric method; Hospital.

## ABSTRACT

This cross-sectional, hospital-based study conducted between January 2006 and March 2008 sought to estimate the resistance of *M. tuberculosis* to first-line drugs among patients with tuberculosis at a Brazilian hospital and evaluate the performance of the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT) microplate assay in comparison to the BACTEC-MGIT 960™. The prevalence of *M. tuberculosis* resistance was 6.7%; multidrug-resistance [rifampin (RMP) and isoniazid (INH)] and resistance to INH and streptomycin (SM) were detected in 1%, in 3.8% and in 3.8% of cases, respectively. All isolates were susceptible to ethambutol (EM). The resistance was primary in four cases and acquired in three cases. Previous treatment was associated with resistance ( $p=0.0181$ ). Among 119 isolates of *M. tuberculosis*, there was 100% observed agreement for INH and EM between the MTT and BACTEC-MGIT 960™ methods. For RMP, the observed agreement was 99% (sensitivity: 90%), and for SM, the level of agreement was lower (95.2%; sensibility 90.9%) than those of the other drugs. The colorimetric method with tetrazolium (MTT) represents an accurate, simple and low cost alternative that is both viable and sustainable for settings with limited resources.

## INTRODUCTION

*M. tuberculosis* multidrug resistance is an emerging global problem. The World Health Organization has estimated that 14% of all TB new cases involve multidrug-resistance (1). In the last decade, tuberculosis multidrug resistance (TB-MDR) was observed in 0.9% of new Brazilian TB cases diagnosed in primary health care units (2). This epidemiological picture is changing, according to the Brazilian Ministry of Health Program: more recent data indicate increased resistance, and, in the near future, the initial standard regimen will be changed to four drugs.

In this context, early detection of *M. tuberculosis* resistance is an international and local public health priority, primarily for health care facilities located in metropolitan areas having high levels of population density and HIV infection and a large number of institutionalized and homeless people. The challenge is to develop and implement a new drug susceptibility test (DST) accurate enough to identify drug resistance, but also having low costs, sustainability and capillarity. New DSTs have attempted to fulfill these requirements. Colorimetric assays have been proposed, from alternative cost-effective methods to automated phenotypic and high-cost genotypic methods. Colorimetric methods using Alamar Blue, resazurin or [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT) reveal cellular viability in the presence of different drug concentrations and determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the drugs (3-6).

In this study, we tested patients with tuberculosis at a Brazilian hospital in order to estimate the prevalence of *M. tuberculosis* resistance to first-line drugs and to evaluate the performance of the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide] (MTT) microplate assay compared to BACTEC-MGIT 960™.

## **PATIENTS AND METHODS**

A retrospective, cross-sectional study was performed at a Brazilian tertiary health-care facility, in the Campinas metropolitan area, a region of five million inhabitants. In this area, the recent TB incidence rate was 48 per 100,000 inhabitants. We defined two study groups: the group of prevalence study (P-group) and the group of MTT performance evaluation (MTT-group). The P-group included patients at least 14 years of age who had a TB diagnosis by positive culture for *M. tuberculosis* reported to the surveillance system between January 2006 and March 2008. In order to select the P-group, we evaluated 360 cases reported to the surveillance system and included 105 patients. The second group (MTT-group) consisted of all the patients in the P-group, with an additional 14 cases of confirmed resistance to first-line drugs prior to the study.

The susceptibility patterns of *M. tuberculosis* were tested by MTT assay and BACTEC-MGIT 960™. The reference susceptibility patterns were performed by the Mycobacteriology Division of the “Instituto Adolfo Lutz”, the regional laboratory for Sao Paulo State. The MTT assay was performed according Franzblau *et al.*, 1998 (3) for the

following drugs: isoniazid (INH), rifampicin (RMP), ethambutol (EM) and streptomycin (SM). Suspensions of *M. tuberculosis* were prepared by emulsifying growth from slants with 2 ml 7H9 broth (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) and incubated at 37°C for seven days. The turbidity was then adjusted to McFarland standard n° 3 by adding Middlebrook 7H9. Middlebrook 7H9 was prepared with 0.47 g 7H9 broth base (Difco, Detroit, Mich.), 0.2 ml of glycerol, 90 ml of distilled water and 10 ml OADC each of oleic acid, albumin, dextrose, and catalase (Becton-Dickinson). Drug stock solutions were prepared at concentrations of 10 mg/ml for RMP in methanol. Two different stock solutions were prepared with EM (distilled water with and without 20% ethanol) and SM (distilled water with and without 5% phenol).

Microdilution plates were prepared in the following manner: 200 µl of sterile water was added to all the outer wells. Portions (100 µl each) of 7H9 broth were then added to columns 2 to 11 in rows B to G. One-hundred aliquots of 4x antibiotic solutions (INH, RMP, SM and EM) were added to column 2 in rows B to G. One hundred µL of solution were transferred from column 2 to column 3 with a multi-channel pipette. The antibiotics were serially diluted 1:2 in consecutive columns, except for column 11, where 100 µl of excess medium was discarded. The final drug concentration ranges were 0.015 to 16 µg/ml for INH, 0.015 to 16 µg/ml for RMP, 0.01 to 16 µg/ml for SM and 0.03 to 16 µg/ml for EM. One hundred µL of a log-phase *M. tuberculosis* bacterial suspension (20 to 30 days old) was added to wells in rows B to G in columns 2 to 11 with a pipette. The wells in columns 10 and 11 in row H served as inoculum controls. The plates were sealed with

Parafilm and plastic bags and incubated at 37°C for 6 or 7 days. On day 6, 15 µl of the tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide] [Sigma-Aldrich] at 5 mg/ml and 10% absolute ethanol and 90% water was added to well H10. The plate was then incubated at 37°C for 24 h. If the color of the H10 well turned purple, MTT solution was added to all the wells and the color was recorded at 24 h. If color of the H10 well remained yellow, the plates were incubated for another 24 h, after which MTT solution was added to well H11 before the plate was incubated for another 24 h. Isolates were considered to be drug susceptible if their MICs were below or equal to the critical concentration reported by Martin *et al.*, 2005 (7): INH, 0.25 µg/ml; RMP, 0.5 µg/ml; EM, 4 µg/ml; SM, 1 µg/ml. The critical concentrations of BACTEC-MGIT 960™ reported by the manufacturer's protocol were as follows: INH, 0.10 µg/ml; RMP, 1.0 µg/ml; EM, 5.0 µg/ml; SM, 1.0 µg/ml.

Statistical analysis was performed by using the Epi-Info software, version 6.04b (Atlanta, Georgia, USA). Categorical variables were analyzed by using the chi-square (Yates-correction) and two-tailed Fisher exact tests. P-values <0.05 were considered statistically significant. The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas.

## Results

Among the 105 patients included in the P-group, 78 (74.3%) were male, and the median age was 36 years. Pulmonary presentation alone was observed in 68 (64.8%) cases, extra-pulmonary in 11 (10.5%) and combined (pulmonary and extra-pulmonary) in

26 (24.7%) patients. Disseminated disease occurred in 7 (18.9%) cases. Thoracic x-rays were classified as suggestive of TB in 82 (78.1%) cases. Among the 94 (89.5%) patients with pulmonary involvement, 66 (62.9%) had sputum that smeared positive for acid-fast bacilli, and 82 (78.1%) had *M. tuberculosis*-positive cultures in the sputum. In other specimens, acid-fast bacilli were visualized in 13 (12.4%) cases and the culture was positive in 39 (37.1%) cases. HIV co-infection was diagnosed in 39 (37.1%) cases. Of the 10 patients having previous treatment, 6 (5.7%) were cured, 3 (2.8%) were default and one case failed.

The prevalence of *M. tuberculosis* resistance was 6.7%. Multidrug resistance was detected in one case, and for INH and SM the resistance rate was 3.8% (Table 1). The resistance was primary in four cases and acquired for three. Previous treatment was associated with resistance ( $p=0.0181$ ); however, HIV was not related to resistance. Favorable treatment outcomes occurred in 67 (63.8%) cases, death in 26 (24.8%) cases, and default in 12(11.4%) cases. Of the seven patients with drug-resistance, four were cured, two died and two lost her follow-up. The patient with TB-MDR was cured at the eighteenth month of the treatment.

Analysis of the MTT-group (119 isolates of *M. tuberculosis*) showed agreement between the MTT and BACTEC-MGIT 960™ methods in 100% for INH and EM, in 99% for RMP and 95.2% for SM (Table 2).

## DISCUSSION

TB resistance was lower in our study than in other Brazilian studies performed at tertiary care facilities. Although few Brazilian hospital-based studies have specifically evaluated this question, the resistance rates reported by other studies were higher. For RMP, INH or any drug, the rates varied from 3.6% to 4.3%, 10.9% to 13% and 13.3% to 19.2%, respectively (8,9,10). Our results can be explained by the characteristics of the study population, including: the number of cases evaluated, the absence of previous treatment in the majority of the study's patients and the TB incidence rate in Campinas metropolitan area being lower than that of Rio de Janeiro, where the majority of Brazilian studies had been conducted.

TB-MDR has been evaluated in other Brazilian hospitals with higher rates than those observed in the general population. In the 1990s, national surveillance of resistance in basic health care units found 0.9% of TB-MDR and 8.6% of cases were resistant to any drug. Similar results were observed in São Paulo city (11,12).

The association between resistance and previous treatment was demonstrated in our study and in other studies (8,13,14). In Brazil, acquired resistance was related to inadequate adherence, strengthening the necessity to extend Directly Observed Therapy (DOTS).

The general performance of MMT microplate assay was adequate for INH, RMP and EM. The assay presented good agreement with BACTEC-MGIT 960™; however, a small number of TB resistance isolates was tested. These results are compatible with results reported by other authors (4,5,6,15,16). DST for EM and SM has presented low reproducibility (15). Martin *et al.* (2005), in a multicentric study of the MTT assay, reported specificity and sensitivity for SM of 85% and 90.5%, respectively (7). This is probably associated with the drug's stability. In our study, we tested ethanol added in minimal concentrations to improve the stability of EM (phenol was added in the case of SM.) This approach represents a possible alternative aimed at improving the performance of EM and SM evaluation through MTT.

In addition, MTT microplate assay has been widely utilized for second-line antimycobacterial drugs. Expertise with this method assumes great importance in the context of the global rise in multidrug-resistance, primarily in developing countries.

Overall efficiencies between MTT and resazurin assays have been similar, with high accuracy, except for SM (7). According previous descriptions, MTT allows better interpretation of colors, thus facilitating its standardization (6). One test for four drugs with MTT and resazurin costs \$5 US and \$3 US, respectively, whereas the test performed by Bactec-MGIT 960 costs \$39 US (1,16).

The next steps toward standardizing the colorimetric tests MTT and resazurin for clinical decisions depends on phases III (performance) and phase IV (cost-effectiveness) clinical trials, involving comparison with reference methods (18). A study

using cost-effectiveness analysis to compare five different DST methods, including the MTT assay, was performed in Peru. In this study it was observed that all the methods to identify multidrug-resistant tuberculosis in middle-income countries were cost-effective. Including the costs savings from reduced transmission, the MTT had the second lowest cost-per-DALY gained (\$95). New research has developed colorimetric methods that enable the direct diagnosis of resistance from clinical specimens (20).

The colorimetric method with MTT represents an accurate, simple alternative test with costs lower than the automated phenotypic and genotypic methodologies. This is a boon for settings with limited resources and provides for sustainable of resistance surveillance – a critical step in global tuberculosis control.

**Table 1. Prevalence of resistance to first-line antimycobacterial agents among tuberculosis cases performed by MTT microplate assay and BACTEC-MGIT 960™\*.**

	Resistant		Susceptible	
	N=7	%	N = 98	%
Isoniazid	4	3.8	101	96.2
Rifampin	1	1.0	104	99.0
Ethambutol	0	0	105	100
Streptomycin	4	3.8	101	96.2
Isoniazid + Rifampin	1	1.0	104	99.0
Total	7	6.7	98	93.3

---

\* BACTEC-MGIT96™ was considered the benchmark test when the results were discrepant.

**Table 2. Performance of MTT microplate assay compared with BACTEC–MGIT960.**

		<b>MTT</b>						
		N=119						
<b>Drug</b>	<b>MGIT</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>PR</b>	<b>Sens.</b>	<b>Spec.</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
		<b>n</b>	<b>n</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Isoniazid	S	104	0	0	100	100	100	100
	R	0	15	0				
Rifampicin	S	109	0	0	90	100	100	99
	R	1	9	0				
Ethambutol	S	117	0	0	100	100	100	100
	R	0	2	0				
Streptomycin	S	108	0	0	90.9	100	100	99.1
	R	1	6	4				

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay; MGIT: BACTEC–MGIT960; R: resistant, S: susceptible; PR: partially resistant; Sens: sensitivity; Spec: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

## REFERENCES

1. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 2002-2007. Geneva, Switzerland, WHO, 2008 (WHO/HTM/TB/2008.394).
2. Natal S, Toledo A, Penna MLF, Barreto A, Vasconcellos C, Gerhart G. Primary and secondary drug resistance in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1 (Suppl.1): S45 (abstract).
3. Franzblau SG, Witzig RS, Mcclaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A et al. Rapid, low-technology CMI determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 362-363.
4. Palomino JC, Portaels F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18(5):380-383.
5. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5):1873- 1874.
6. Osório MR, Gomes Silva da M, Senna GS, Rossetti ML, Fonseca S.L. Evaluation of rapid microplate assays using cellular-viability indicators to determine patterns of susceptibility of isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Bras Pneumol* 2004; 30 (4): 455-460.
7. Martin A, N Morcillo, Lemus D, Montoro E, Silva Telles da MA, Simboli N et al. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9(8):901–906.
8. Aguiar F, Vieira MA, Staviack A, Buarque C, Marsico A, Fonseca L et al. Prevalence of anti-tuberculosis drug resistance in a HIV/AIDS reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13(1):54-61.

9. Souza de MB, Antunes Figueiredo de CA, Garcia GF. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* at a referral center for infectious diseases in the state of Minas Gerais, Brazil: sensitivity profile and related risk factors. *J Bras Pneumol* 2006; 32(5): 430-437.
10. Brito RCGC, Lima DB, Siqueira H, Cavalcanti HR, Pereira MM, Kritski AL. Resistência aos medicamentos anti- tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de aids no Rio de Janeiro. *J Bras Pneumol* 2004; 30(4):335-342.
11. Silva Telles da MA, Ferrazoli L, Waldman EA, Giampaglia CMS, Martins MC, Euki SYM. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in a urban community. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9(9):970-976.
12. Pablos-Méndez A, Raviglione M, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Buestro F, Cohn DL *et al.* Global surveillance for antituberculosis-drugs resistance, 1994-1997. *N Engl J Med* 1998; 338(23): 1641-1649.
13. Fandinho FCO, Kritski AL, Hofer C, Conde Jr H, Ferreira RMC, Silva MG *et al.* Drug resistance patterns among hospitalized tuberculous patients in Rio de Janeiro, Brazil, 1993-1994. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(4):543-547.
14. Melo FAF, Afiune JB, Ide Neto J, Almeida de EA, Spada DTA, Antelmo ANL *et al.* Aspectos epidemiológicos da tuberculose multiresistente em um serviço de referência da cidade de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(1):27-34.
15. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994–1997. Geneva, Switzerland, 1997 (WHO/TB/97.229).
16. Mengatto L, Chiani Y, Imaz MA. Evaluation of rapid alternative methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(5): 535-542.
17. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the rezasurin microtitre assay

for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(4):500-505.

18. Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods. *J Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13(8): 754-762.

19 Villaorduna-Acuna, Vassall A, Henostroza G, Seas C, Guerra H, Vasquez L et al. Cost-effectiveness analysis of introduction of rapid alternative methods to identify multidrug – resistant tuberculosis in middle- income countries. *Clin Infect Dis*.2008; 47(4):487-495.

20. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006; 6:423–32.