



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

RENATA LYRIO PERES NÓBREGA

**AVALIAÇÃO DO USO DE ANTI-SÉPTICOS BUCAIS PARA REDUÇÃO DA TAXA
DE CONTAMINAÇÃO DE CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE
ESCARRO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TUBERCULOSE**

Vitória
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RENATA LYRIO PERES NÓBREGA

AVALIAÇÃO DO USO DE ANTI-SÉPTICOS BUCAIS PARA REDUÇÃO DA TAXA DE CONTAMINAÇÃO DE CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE ESCARRO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TUBERCULOSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências - Patologia das Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof. Dra. Ethel Leonor Noia Maciel

Co-orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

Vitória
2009



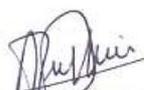
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

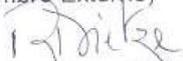
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

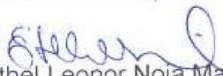
A mestranda RENATA LYRIO PERES NÓBREGA, apresentou dissertação intitulada: "AVALIAÇÃO DO USO DE ANTI-SÉPTICOS BUCAIS PARA REDUÇÃO DA TAXA DE CONTAMINAÇÃO DE CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE ESCARRO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TUBERCULOSE" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

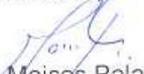
Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar a bióloga RENATA LYRIO PERES NÓBREGA, a obter o Grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – PATOLOGIA GERAL DAS DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 03 de abril de 2009.


Prof. Dr. Antônio Ruffino Netto
(Membro Externo)


Prof. Dr. Reynaldo Dietze
(Membro Interno)


Prof.ª Dr.ª Ethel Leonor Noia Maciel
(Orientadora)


Prof. Dr. Moises Palaci
(Co-Orientador)

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

N754a Nóbrega, Renata Lyrio Peres, 1975-
Avaliação do uso de anti-sépticos bucais para redução da taxa de contaminação de culturas de micobactérias em amostras de escarro de pacientes com suspeita de tuberculose / Renata Lyrio Peres Nóbrega. – 2009.
113 f. : il.

Orientador: Ethel Leonor Noia Maciel.

Co-Orientador: Moisés Palaci.

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

1. Contaminação de culturas (Biologia). 2. Anti-sépticos bucais. 3. Tuberculose. 4. Diagnóstico. I. Maciel, Ethel Leonor Noia. II. Moisés Palaci. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Dedico este trabalho

Aos meus queridos pais, Léa e Bento,

Pelo amor incondicional, por jamais terem poupado esforços na formação de seus filhos e principalmente por terem me ensinado a enfrentar os obstáculos da vida com perseverança, fé e coragem.

Ao meu irmão, Luiz Felipe,

Pela alegria, carinho e amizade que existe entre nós, por me ouvir e aconselhar nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo, Marcos

Sinônimo de apoio, incentivo e compreensão, que me acompanhou nessa caminhada em busca dos meus sonhos sem nenhuma cobrança. Você sabe a importância que teve para que chegasse onde estou. Meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em todos os momentos da minha vida, e por me conceder paz nos momentos de dificuldades e angústias.

A minha orientadora, Dr^a. Ethel Leonor Noia Maciel, cujo exemplo, principalmente de competência, empolgação e determinação estão gravados de forma indelével em minha alma. Agradeço por ter acreditado na minha capacidade e pela excelência com que conduziu minha orientação nesses dois anos de trabalho. Minha profunda gratidão.

Ao Prof. Dr. Moisés Palaci, e de fato, também orientador, que me aceitou como parte de sua equipe e me ensinou a trabalhar com pesquisa. Agradeço pelo cuidado especial em ensinar a maneira crítica com a qual a ciência deve ser encarada e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Reynaldo Dietze, coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas, a minha admiração por todos os desafios enfrentados para a manutenção deste respeitado centro de pesquisa. Obrigada por permitir que eu faça parte da sua equipe.

Ao Prof. Dr. Antônio Ruffino Netto, por quem sempre tive grande respeito e profunda admiração, pela incessante vontade de saber e partilhar seus conhecimentos. Agradeço imensamente pela contribuição com suas sugestões em meu trabalho, e por ter aceitado participar da minha banca de mestrado.

A Prof^a. Dra. Elenice Moreira Lemos, por toda a sua ajuda que foi fundamental para conclusão desse trabalho. Obrigada pela amizade.

As médicas Dra. Mariângela C. Teixeira e Dra. Queila P. de Melo Amorim pela valiosa colaboração na captação e análise dos dados clínicos dos pacientes, sem vocês esse trabalho não seria possível.

A médica Dra. Daniela Mill Damasceno, pela colaboração na captação e análise dos dados clínicos dos pacientes e pela paciência. Obrigada amiga!

As funcionárias da Unidade Básica de Saúde da Serra-ES, Luciene, Alessandra e Dulce que me receberam de forma tão carinhosa e sempre dispostas ao melhor atendimento aos pacientes.

Ao Carlos Gustavo Vieira de Moraes, que se tornou um amigo tão especial, pela companhia constante, por tudo que aprendemos juntos, por compartilhar alegrias e tristezas, ansiedades, vitórias e derrotas.

A minha querida amiga, Rafaela Borge Loureiro, meus mais sinceros agradecimentos pelo seu carinho, paciência, dedicação e apoio constantes e, principalmente por me encorajar nos momentos mais difíceis. Obrigada pela sua amizade!

A Maria Júlia de Aguiar Nóbrega (minha sogrinha), minha profunda admiração e agradecimento pela correção ortográfica do texto.

A Fabíola Karla Côrrea Ribeiro, pela amizade de muitos anos, por me mostrar que posso sempre mais e pelo apoio e palavras de incentivo sempre constante.

Aos meus queridos amigos, Thiago, Aretha, Juliana, Karina e Lucília pela convivência e pela amizade que partilharam comigo novos ensinamentos e tantas experiências. Em especial a Thiago, por sempre estar disposto a ouvir meus desabafos e por me ajudar com paciência na análise estatística dos dados.

Aos amigos e pesquisadores do laboratório Laboratório de TB: Solange, João, Maria, Cynthia e Hildete por estarem sempre presentes nos momentos em que precisei, por sempre valorizar o espírito de equipe e o aperfeiçoamento constante. Em especial a Maria, por suprir com competência e dedicação a minha ausência no laboratório.

As minhas amigas de longa data Carla Baroni Cunha, Tatiana de Resende Có Pelição, Valéria Pereira Cabral e Marcela Segatto pelo carinho, amizade, pelas nossas conversas, sempre prontas a dar uma palavra de estímulo.

Aos membros do Grupo EpiTB, pelo carinho e apoio, e por me ouvir incansavelmente falar de anti-sépticos bucais e TB.

À minha família, pelo apoio constante dado durante toda a realização deste trabalho.

A todos os funcionários do NDI, por proporcionarem uma convivência sempre tão agradável.

Aos nossos professores, por terem dividido conosco seus conhecimentos e por terem nos incentivado a dar sempre o melhor de nós.

A Fátima Aparecida Pereira, secretária da pós-graduação, por todos estes anos de amizade e pelo auxílio nas questões burocráticas.

Ao Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória (FACITEC) pela concessão de bolsa do mestrado e pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

Ao International Clinical Operational and Health Services Research and Training Award, EDITAL ICHORTA 5U2R TW006883-02.

Aos pacientes que voluntariamente participaram desta pesquisa e que depositam em nós a esperança de viverem dias melhores.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”

Albert Einsten

RESUMO

A busca de Sintomáticos Respiratórios (SRs) é uma importante estratégia para a detecção de novos casos de TB. Apesar da importância do diagnóstico clínico e da baciloscopia, a cultura continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico definitivo da tuberculose. No entanto, a contaminação da cultura com outros microrganismos da microbiota oral, que contaminam o meio de cultura impedindo a multiplicação dos bacilos, afeta o diagnóstico da doença, principalmente em pacientes paucibacilíferos. Uma estratégia utilizada para minimizar a presença de bactérias contaminantes e fungos que fazem parte da microbiota oral é o uso de anti-sépticos como complemento à higienização bucal. Esse estudo se propõe a avaliar através de um ensaio clínico pragmático a eficácia de métodos de anti-sepsia intrabucal na redução do número de organismos contaminantes em culturas de pacientes SRs. Para isso, foram avaliados 120 pacientes. No primeiro dia da coleta os pacientes foram orientados a realizar a higiene bucal com água (grupo controle). No dia seguinte, os mesmos pacientes foram selecionados aleatoriamente em dois grupos de estudo para realização da segunda coleta de escarro: 59 pacientes realizaram a higienização com o anti-séptico digluconato de clorexidina (CHX) e 61 pacientes fizeram a anti-sepsia com o cloreto de cetilpiridínio (CPC). Adicionalmente, foi avaliado o uso de uma concentração maior do antimicrobiano PANTA (1X e 2X) no meio MGIT. A taxa de contaminação encontrada nas amostras dos pacientes que utilizaram o anti-séptico CHX foi significativamente menor que a observada nas amostras dos pacientes que fizeram a higienização bucal somente com água, principalmente nas amostras inoculadas no meio MGIT ($p= 0, 0391$). Para as amostras controles inoculadas no MGIT utilizando PANTA 2X foi observada uma diminuição significativa da taxa de contaminação das culturas ($p=0,0059$). Esses resultados sugerem que a higienização com o anti-séptico clorexidina auxilia na diminuição da taxa de contaminação das culturas de micobactérias. Além disso, foi demonstrado que o uso de PANTA (2X) no meio MGIT ajuda na diminuição do índice de contaminação das culturas dos pacientes SRs.

ABSTRACT

Identifying individuals with respiratory symptoms is considered an important strategy in detecting new cases of tuberculosis (TB). Although clinical and radiographic findings play an important role in the diagnosis of TB, a positive culture of *Mycobacterium tuberculosis* is a definitive diagnostic evidence of this disease. However, cultures can be contaminated with organisms from the oral microbiota that avoid the multiplication of the tubercle bacilli and interfere in the diagnosis, especially in paucibacillary patients. Oral antiseptics have been used as a complement to oral hygienization in order to minimize proliferation of contaminant organisms. In the present study, we assessed the efficacy of intraoral anti-sepsis methods in the reduction of culture contamination. A hundred-twenty patients with respiratory symptoms were analyzed. On the first visiting day, a sputum sample was collected after the patient was oriented to do the oral hygienization using water (control group). On the next day, the same patient was selected at random to join one of two different groups before collecting the second sputum sample: 59 patients did oral hygienization using chlorhexidine gluconate (CHX) and 61 patients did oral hygienization using cetylpyridinium chloride (CPC). The use of different concentrations of PANTA antibiotic (1X e 2X) on MGIT medium was evaluated. The contamination rate found for the group of patients that used the antiseptic CHX was significantly lower than the one observed for the group of patients that used just water for oral hygienization, especially on MGIT cultures ($p= 0,0391$). The contamination rate was also significantly lower when samples were inoculated on MGIT medium supplemented with PANTA 2X ($p=0, 0059$). These results suggest that the use of CHX in oral hygienization is effective in reducing the contamination of mycobacteria culture with other organisms. In addition, the use of MGIT medium supplemented with PANTA 2X was also helpful in reducing the culture contamination rate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS /SIDA: do inglês “Acquired Immunodeficiency Syndrome” ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BAAR: Bacilo Álcool-Ácido Resistente

BCG: Bacilo bileado de Calmette-Guérin, variante atenuada do *Mycobacterium bovis*

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CHX: Clorexidina

CPC: Cloreto de cetilpiridínio

CO₂: Gás carbônico

DP: Desvio Padrão

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HUCAM: Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

IC: Intervalo de Confiança

MGIT: Tubo Indicador de Crescimento Micobacteriano

mL: Milílitro

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

NALC: N-acetil-L-cisteína

NaOH: Hidróxido de Sódio

NDI: Núcleo de Doenças Infecciosas

OADC: Ácido Oléico, Albumina, Dextrose e Catalase

OD: *odds ratio*

O₂: Oxigênio

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Panamericana de Saúde

PANTA: Mistura de Antibióticos Polimixicina B, Anfotericina B, Ácido Nalidixico, Trimetoprim, Azlocilina

TB: Tuberculose

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

μL: Microlitro

x g: força centrífuga

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e dos fatores de risco para os grupos de estudo CHX e CPC.....	57
Tabela 2	Principais sintomas apresentados pelos pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar para os grupos CHX e CPC.....	59
Tabela 3	Caracterização das variáveis que interferem no exame de cultura por grupo de estudo (CHX e CPC).....	60
Tabela 4	Avaliação da taxa de contaminação das culturas no meio sólido e líquido a partir de amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle e do grupo de intervenção pelo CHX.....	62
Tabela 5	Avaliação da taxa de contaminação das culturas no meio sólido e líquido a partir de amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle e do grupo de intervenção pelo CPC.....	63
Tabela 6	Avaliação da taxa de contaminação das culturas no meio líquido MGIT a partir de amostras de escarro coletadas de pacientes após a higienização com água (grupo controle).....	66
Tabela 7	Avaliação da taxa de positividade das culturas no meio Ogawa e MGIT para amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle.....	67
Tabela 8	Avaliação da contribuição do uso de anti-sépticos bucais para o exame de cultura de micobactérias em meio MGIT	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número estimado de casos de tuberculose em 2006.....	27
Figura 2	Fluxograma da logística operacional da coleta das amostras de escarro.....	48
Figura 3	Fluxograma dos procedimentos realizados após o processamento das amostras.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Análise comparativa da taxa de contaminação no meio Ogawa e no meio líquido MGIT para os diferentes grupos de estudo.....	64
Gráfico 2	Análise comparativa dos organismos contaminantes presente nas amostras dos pacientes nos diferentes grupos de estudo.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVO.....	24
2.1	Objetivo geral.....	24
2.2	Objetivos Específicos.....	24
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3.1	Tuberculose	26
3.1.1	Aspectos Epidemiológicos	26
3.1.2	Agente Etiológico	28
3.1.3	Transmissão e Patogenia	30
3.2	Diagnóstico	31
3.2.1	Diagnóstico Clínico	32
3.2.1.1	A busca do sintomático respiratório enquanto estratégia para detecção de casos de tuberculose	33
3.2.2	Diagnóstico Radiológico	34
3.2.3	Diagnóstico Bacteriológico.....	35
3.2.3.1	Baciloscopia.....	35
3.2.3.2	Cultura.....	36
3.2.3.3	Fatores relacionados à contaminação das culturas de micobactérias	39
3.2.3.4	Utilização de anti-sépticos bucais na prevenção de microrganismos contaminantes da cavidade oral	42
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Local e Modelo de Estudo	45
4.2	Seleção dos Pacientes	45
4.3	Coleta de Dados	46
4.4	Grupos de Estudo	47
4.5	Coleta e Transporte das Amostras	49
4.6	Processamento das Amostras	49

4.7	Baciloscopia	51
4.8	Cultura qualitativa em meio sólido Ogawa para isolamento do <i>M. tuberculosis</i> e detecção de outros organismos contaminantes	51
4.9	Cultura qualitativa em meio líquido MGIT BACTEC 960® para isolamento do <i>M. tuberculosis</i> e detecção de outros organismos contaminantes.....	52
4.10	Identificação do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> através de métodos fenotípicos	53
4.11	Tamanho da Amostra	53
4.12	Processamento dos Dados	53
4.13	Análise Estatística.....	54
4.14	Aspectos Éticos	54
5	RESULTADOS	56
5.1	Caracterização dos indivíduos nos grupos de estudo (CHX ou CPC)	56
5.2	Caracterização das variáveis que interferem no exame de cultura por grupos CHX e CPC.....	59
5.3	Análise da taxa de contaminação das culturas obtidas a partir de amostras dos pacientes antes e após intervenção com os anti-sépticos CHX e CPC.. ..	61
5.4	Análise comparativa dos grupos CHX e CPC em relação aos resultados de contaminação das culturas inoculadas no meio Ogawa e MGIT	63
5.5	Análise da taxa de contaminação das culturas a partir de amostras de escarro do grupo controle em meio MGIT nas concentrações de PANTA1X e PANTA 2X.....	65
5.6	Análise da taxa de positividade das culturas a partir de amostras de pacientes do grupo controle e de intervenção	66
5.7	Contribuição do uso de anti-sépticos bucais para o exame de cultura de micobactérias.....	67
6	DISCUSSÃO.....	70
6.1	Caracterização da população estudada nos grupos de estudo	71

6.2	Análise comparativa dos grupos CHX e CPC em relação as variáveis que interferem no exame bacteriológico	73
6.3	Análise da taxa de contaminação das culturas de amostras obtidas dos pacientes antes e após intervenção com os anti-sépticos CHX e CPC	75
6.4	Análise da taxa de contaminação das culturas a partir de amostras do grupo controle em meio líquido MGIT nas concentrações de PANTA 1X e PANTA 2X	76
6.5	Contribuição do uso de anti-sépticos bucais para o exame de culturas de micobactérias.....	77
7	CONCLUSÕES.....	81
8	PERSPECTIVAS	83
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	ANEXOS.....	99

Introdução

1 Introdução

A Tuberculose (TB) continua sendo um grave problema de saúde pública mundial, especialmente nos países em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde estima que um terço da população mundial esteja infectado por *Mycobacterium tuberculosis*. Em 2006, estimou-se a ocorrência de 9,2 milhões de casos novos de tuberculose e a morte de aproximadamente 1,7 milhões de pessoas (WHO, 2008).

No Brasil e na maioria dos países em desenvolvimento, o diagnóstico laboratorial da TB baseia-se rotineiramente no exame microscópico direto do escarro, a baciloscopia. Esse método é o mais empregado nos serviços de saúde por ser um método diagnóstico de fácil execução, rápido e barato. O exame apresenta boa especificidade em áreas de alta taxa de prevalência (PERKINS, 2000), porém apresenta algumas limitações, dentre as quais podemos citar a grande quantidade de bacilos que são necessários para a positividade do teste (BRODIE & SCHULGER, 2005). Outro inconveniente está relacionado com o fato de a baciloscopia identificar o microrganismo como bacilo álcool ácido resistente (BAAR), sendo incapaz de distinguir o *Mycobacterium tuberculosis* das demais micobactérias (RIBEIRO et al., 1995; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA TUBERCULOSE, 2002).

Existe ainda a possibilidade de obtenção do diagnóstico da doença mediante a identificação laboratorial através de métodos de biologia molecular, entretanto, nenhum desses métodos se mostrou até o momento, mais sensível do que a cultura, principalmente em amostras de pacientes paucibacilíferos. Isso se deve ao fato de que este método é capaz de detectar de 10 – 100 bacilos/mL na amostra examinada (HOBBY et al., 1973), além de permitir o isolamento e a identificação do agente etiológico, avaliação de novas drogas e ou esquemas terapêuticos (análise quantitativa do *M. tuberculosis* no escarro); tipagem molecular do *M. tuberculosis*; determinação de resistência do *M. tuberculosis* aos quimioterápicos e análise de virulência (DUNLAP, 2000; PALOMINO, 2005).

No entanto, a contaminação da cultura com outros microrganismos, além das micobactérias que estão associados à microbiota oral e podem se desenvolver muito mais rapidamente, contaminando o meio de cultura e impedindo a multiplicação dos bacilos (BUIJTELS & PETIT, 2005) é um dos aspectos operacionais que ainda

limitam a sua utilização. Este problema a despeito das inovações científicas, ainda permanece insolúvel, como pode ser constatado em uma série de publicações que relatam altas taxas de contaminação nos meios de cultura líquidos (BACTEC 12B e MGIT) e sólidos, que variam de 4 a 15% (CORNFIELD et al., 1997; TORTOLI et al., 1999; LEE et al., 2003).

A contaminação de culturas de escarro com outros organismos, como fungos e bactérias, afeta o diagnóstico da doença, podendo fornecer resultados falsos negativos. Esses resultados impedem que um paciente não seja imediatamente tratado, aumentando os riscos de transmissão da doença, principalmente quando o paciente é paucibacilífero e apresenta lesões iniciais (CORNFIELD et al., 1997; HANNA et al., 1999; BUIJTELS & PETIT, 2005). Neste caso é necessário eliminar a microbiota associada, que cresce mais rapidamente que as micobactérias, contaminando o meio de cultura e impedindo a multiplicação dos bacilos (KENT & KUBICA, 1985).

Sob a óptica aqui apresentada podemos concluir que os exames bacteriológicos são fundamentais para o diagnóstico da tuberculose, porém, por si só não asseguram a confiabilidade dos resultados. O êxito do isolamento e identificação do *M. tuberculosis* pode estar não apenas relacionado aos métodos de descontaminação utilizados durante o processamento das amostras, mas também às boas práticas clínicas, sobretudo no que se refere aos procedimentos e orientações de coleta fornecida pelos profissionais das Unidades de Saúde, ao transporte e o armazenamento das amostras (MACIEL et al., 2008).

Uma estratégia que pode ser utilizada para diminuir a contaminação das culturas de micobactérias pela microbiota oral do paciente é o uso de anti-sépticos bucais antes da coleta do escarro.

Em geral, os anti-sépticos não apresentam composição complexa, o diferencial neste tipo de produto é a sua eficácia antimicrobiana. Os anti-sépticos bucais rompem a parede celular e inibem a atividade enzimática da célula microbiana. Adicionalmente, diminuem a multiplicação e previnem a agregação bacteriana (McDONNELL & RUSSEL, 1999). Segundo Barros e colaboradores (1998), o emprego de anti-sépticos utilizado em bochecho, reduz a população de bactérias aeróbias e anaeróbias da cavidade oral, especialmente os estreptococos.

No entanto, as micobactérias mostram-se geralmente resistentes à ação de anti-sépticos como a clorexidina e o cloreto de cetilpiridínio, porém poucos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito desses anti-sépticos frente às micobactérias (McDONNELL & RUSSEL et al., 1999; PARDINI et al., 2005). Em um estudo realizado por Rikimaru e colaboradores (2000) observou-se que, mesmo em concentrações elevadas, o digluconato de clorexidina (0,5%) não mostrou atividade contra o *M. tuberculosis* e *M. kansasii*.

Com base nas considerações apresentadas, e diante da necessidade de novas metodologias ou estratégias que visem diminuir a taxa de contaminação das culturas de micobactérias em amostras de escarro de pacientes com suspeita clínica ou radiográfica de tuberculose pulmonar, propusemo-nos a avaliar através de um ensaio clínico a eficácia de métodos de anti-sepsia intrabucal na redução do número de organismos contaminantes.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia de métodos de anti-sepsia intrabucal para redução da contaminação de culturas de micobactérias de pacientes com suspeita clínica ou radiográfica de tuberculose pulmonar, atendidos em duas Unidades de Saúde da Região Metropolitana de Vitória-ES.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se fatores tais como tabagismo e uso de prótese dentária podem interferir na taxa de contaminação de culturas para micobactérias;
- Comparar a eficiência dos métodos de anti-sepsia intrabucal (bochecho com água destilada, solução de digluconato de clorexidina e cloreto de cetilpiridínio) na redução da contaminação da cultura para micobactérias de pacientes com suspeita clínica ou radiográfica de tuberculose pulmonar;
- Avaliar a taxa de microorganismos contaminantes (bactérias e/ou fungos), no meio de cultura MGIT, em amostras de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar, e compará-la com os resultados obtidos no meio Ogawa;
- Avaliar duas concentrações do antimicrobiano PANTA (PANTA 1X e PANTA 2X) na redução da contaminação da cultura para micobactérias de pacientes com suspeita clínica ou radiográfica de tuberculose pulmonar.

Revisão Bibliográfica

3 Revisão de Literatura

3.1 Tuberculose

3.1.1 Aspectos Epidemiológicos

A tuberculose é uma das doenças transmissíveis mais antigas do mundo, afetando o homem há milênios. Os primeiros registros históricos de tuberculose humana foram encontrados em fragmentos ósseos da coluna vertebral de múmias do antigo Egito, há 5.000 A.C, que apresentavam deformidades características da doença. Essas deformidades ósseas também foram encontradas em várias populações em diferentes continentes, sugerindo que a tuberculose estava amplamente distribuída por todo o mundo há mais de 4.000 A.C (HERSHKOVITZ et al., 2008).

Nas últimas décadas, o aumento na incidência da tuberculose tem sido atribuído à desigualdade social, ao envelhecimento da população, a grandes movimentos migratórios, ao advento da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), à elevação da taxa de abandono do tratamento anti-tuberculose, ao aparecimento da multirresistência, além da deterioração dos serviços de saúde que contribuem para dificultar o seu controle (WHO, 1998; RUFFINO-NETTO A, 2002).

Apesar de vários autores considerarem a tuberculose um problema reemergente, essa afirmativa aparenta ser válida apenas para alguns países desenvolvidos, devido principalmente ao recrudescimento de casos novos pelo surgimento da SIDA e ao aparecimento de cepas multirresistentes a drogas; contudo, essa afirmativa não é válida para o Brasil. Em países em desenvolvimento como o Brasil, a tuberculose não é problema de saúde pública emergente nem tampouco, reemergente, mas um problema constante e presente em nosso meio (RUFFINO-NETTO A, 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial, ou 2 bilhões de pessoas, estejam infectadas por *M.tuberculosis* (Mtb). Em 2006, estimou-se a ocorrência de 9,2 milhões (139/100.000 habitantes) de casos novos de tuberculose e a morte de aproximadamente 1,7 milhão de pessoas, no

qual 200.000 estão associadas a pacientes HIV - positivos. No Brasil, os números são extremamente preocupantes. Neste ano, estimou-se 110.000 casos novos, resultando em um coeficiente de incidência anual médio de 50 casos/100.000 habitantes. O país ocupa a 15ª posição entre os 22 países que abrigam cerca de 80% de todos os casos de tuberculose no mundo (WHO, 2008) (**FIGURA 1**).

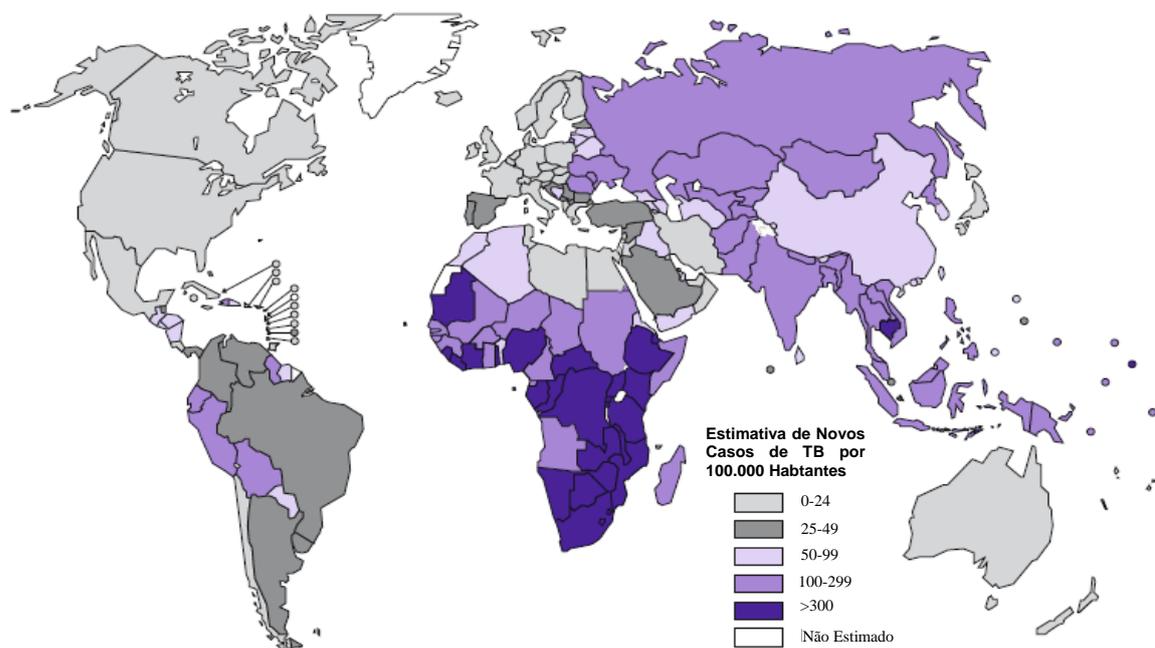


Figura 1 – Número estimado de casos de tuberculose em 2006.

Fonte: WHO, 2008

O Estado do Espírito Santo apresenta uma incidência de 38,0 casos/100.000 habitantes para a TB em todas as formas e uma incidência de 24,6 casos/100.000 habitantes para os casos bacilíferos. A incidência média do estado está, portanto, abaixo da média da Região Sudeste, que é de aproximadamente 47 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2007).

Segundo a OMS, a co-infecção *M. tuberculosis* / Vírus da Imunodeficiência Humana (Mtb/HIV) constituem hoje uma calamidade. Nos pacientes com a co-infecção, o risco de desenvolver a tuberculose após a infecção primária é dez vezes maior do

que no indivíduo infectado apenas com o Mtb (HAVLIR; BARNES, 1999; LIBERATO et al., 2004).

Diante desses indicadores, existe uma grande preocupação com o fenômeno de resistência do *M. tuberculosis* às drogas anti-tuberculose disponíveis. Este fenômeno é, em grande parte, justificado pelo tratamento irregular e/ou inadequado da tuberculose, além do alto custo e escassez de drogas alternativas eficientes contra esses microrganismos, tornando-se responsável por diminuir, de forma acentuada, a probabilidade de cura dos doentes acometidos pelos mesmos (PABLO-MENDES et al., 1998).

3.1.2 Agente Etiológico

Em 1882, o cientista alemão Robert Koch, estabeleceu definitivamente a relação etiológica entre a tuberculose humana e o *M. tuberculosis*. Koch demonstrou o isolamento e forma de cultivo, a partir de tubérculos (granulomas) macerados, do *Mycobacterium tuberculosis*, identificando-o como agente etiológico da doença, e que ficou mais conhecido como bacilo de Koch.

O gênero *Mycobacterium* compreende pequenos microrganismos em forma de bastão ou ligeiramente curvos, medindo 0,2 a 0,6 µm de diâmetro x 1 a 10µm de comprimento. São organismos imóveis, aeróbios estritos, não formadores de esporos e não capsulados. Uma série de aspectos torna esses microrganismos distintos dos demais gêneros bacterianos, muitos dos quais relacionados à composição de sua parede celular, a qual é composta primordialmente por uma variedade de lipídeos complexos. Calcula-se que aproximadamente 60% da parede celular micobacteriana são constituídas de lipídeos que consistem basicamente de ácidos graxos, denominados ácidos micólicos e ceras, o que lhes confere características peculiares como formação de películas em meios líquidos, uma resistência à dessecação, à descoloração por álcool-ácido, álcalis, anti-sépticos e a diversos agentes químicos e antibióticos (WAYNE; KUBICA, 1986). A esse respeito, soluções de hidróxido de sódio, fosfato trissódico ou cloreto de cetilpiridínio não afetam as micobactérias da mesma maneira como afetam microorganismos

contaminantes e podem ser usadas em procedimentos de descontaminação de espécimes antes da realização do cultivo para diagnóstico (KENT & KUBICA, 1985).

Apesar da abundância de espécies existentes no gênero, apenas algumas representantes do mesmo se adaptaram a algum tipo de hospedeiro ou se tornaram patogênicas para animais e humanos. Dentre as que merecem destaque, está o *Mycobacterium tuberculosis* que, sem hospedeiros intermediários, reservatórios no meio ambiente ou vetores, encontrou no homem o seu reservatório natural e mantenedor da espécie (WOLINSKY, 1979).

O *Mycobacterium tuberculosis* pertence à família *Mycobacteriaceae* e é o principal responsável pela tuberculose em seres humanos. É um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, juntamente com o *Mycobacterium bovis*, causador da doença em gado e que eventualmente pode acometer outros tipos de animais e também o homem; o *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guerin), utilizado para vacinação; o *Mycobacterium africanum*, associado à tuberculose em humanos na África (BETHLEM et al., 1995; METCHOCK et al., 1999); o *Mycobacterium microti*, um patógeno isolado com pouca frequência causador da doença em indivíduos imunocomprometidos (VAN SOOLINGEN et al., 1998); *M. pinnipedi*, isolado em animais marinhos (COUSINS et al., 2003); e as subespécies recentemente identificadas – *M. tuberculosis subsp. caprae*, encontrada principalmente em caprinos (ARANAZ et al., 1999) e *M. tuberculosis subsp. canetti*, isolado na África e na Europa (MILTGEN et al., 2002).

O *Mycobacterium tuberculosis* é considerado um microorganismo parasita intracelular facultativo, capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de células fagocitárias. Seu tempo de geração é longo, de aproximadamente 18 horas, em temperaturas próximas a 37°C. Isso pode ser explicado pela predileção dessa bactéria pelos pulmões (devido à tensão de oxigênio existente nesses órgãos), e à demora na sua detecção em meios de cultura e na ação eficiente das drogas utilizadas no tratamento (WOLINSKY, 1979; METCHOCK et al., 1999; KAUFMANN, 2001).

3.1.3 Transmissão e Patogenia

A principal fonte de infecção humana é o indivíduo portador da forma pulmonar bacilífera da tuberculose, ou seja, aqueles que têm a capacidade de eliminarem uma quantidade superior a 5.000 bacilos/ml de escarro, o que permite a detecção desses microrganismos pela baciloscopia. A fala, o espirro e, principalmente, a tosse de um doente de tuberculose pulmonar bacilífera lançam no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados. Apenas as gotículas com diâmetro de 2 a 10 μm (Núcleos de Wells) e poucos bacilos (1 ou 2) conseguem alcançar os bronquíolos e alvéolos pulmonares onde iniciam sua multiplicação (TARANTINO; LEITÃO DE OLIVEIRA, 1990).

Uma vez dentro dos alvéolos, a resposta imunológica humana se inicia com a produção de citocinas e quimiocinas pelas células fagocitárias destruídas, resultando assim em um acúmulo de monócitos e macrófagos. Embora a fagocitose aconteça e parte dos bacilos sejam destruídos, um maior número permanece vivo dentro do fagossoma. A sobrevivência do patógeno dentro da célula é mediada principalmente pela sua habilidade de interferir na maturação do fagossoma, impedindo a acidificação do microambiente que é fundamental para a fusão do fagolissosoma, permitindo assim a sua multiplicação nos estágios iniciais da infecção. A ação de citocinas como a IFN- γ produzidas por células T CD4+, linfócitos T CD8+, células NK bem como por macrófagos é ativar o macrófago infectado e dessa maneira, induzir que esta célula exerça seu papel microbicida, pela ativação da produção de reativos de oxigênio e de nitrogênio, necessários para eliminação do bacilo (STEWART et al., 2003; KAUFMANN, 2004).

Além disso, o IFN- γ estimula o macrófago a liberar TNF- α , citocina importante para a formação do granuloma, lesão típica observada na tuberculose e que, normalmente apresenta características bastante específicas (ROACH et al., 2002). No centro da lesão existe uma ou mais células gigantes, circundadas por diversas células epitelióides. Na periferia encontram-se numerosos linfócitos, alguns macrófagos e poucos plasmócitos. Dois ou mais destes granulomas podem fundir-se, originando nódulos visíveis macroscopicamente – os tubérculos. Frequentemente ocorre uma necrose caseosa de extensão variável no centro do granuloma (PROLLA et al., 2000).

O padrão de resposta do hospedeiro depende de uma primeira exposição (TB primária) ou de uma reação secundária em um hospedeiro já sensibilizado (TB secundária ou pós-primária).

Na tuberculose primária, em 90-95% dos casos, as lesões pulmonares iniciais (Complexo de Gohn) evoluem para fibrose do granuloma com ou sem calcificação do caseo, controlando a infecção. Entretanto, bacilos viáveis podem permanecer na região em latência ou dormência sem causar a doença, e posteriormente devido a algum processo de imunossupressão poderão ser reativados e ocasionar a tuberculose secundária. Em 5-10% a primo-infecção não é contida, seja pelo comprometimento do estado imunológico do indivíduo, seja pela carga infectante ou pela virulência da cepa inalada, além de fatores relacionados ao ambiente (aglomeração, ventilação, umidade, luz solar). Ocorre a liquefação do caseo devido à ação de enzimas líticas liberadas pela degradação dos macrófagos na reação exsudativa tecidual, facilitando o crescimento do bacilo e o desenvolvimento da doença (KRITSKI et al., 2000).

Geralmente, os sinais e sintomas da TB pulmonar são os mesmos observados em outras enfermidades respiratórias (tosse, suores noturnos e febre), sendo a extensão temporal dessas manifestações um dado indicativo da doença (GARAY, 2004).

Diante desses fatores, torna-se de grande importância o diagnóstico precoce da TB para que a resposta terapêutica ao uso de antimicrobianos seja satisfatória, principalmente nos pacientes imunossuprimidos. Ademais, o diagnóstico precoce da TB pulmonar interrompe o ciclo de transmissão da doença e auxilia, portanto, no controle da endemia.

3.2 Diagnóstico

O diagnóstico da tuberculose fundamenta-se na análise conjunta de alguns fatores: evidências clínicas, epidemiológicas, achados radiográficos, teste tuberculínico, além dos exames bacteriológicos. Dentre os exames confirmatórios, fazem parte a baciloscopia e a cultura, que detectam a bactéria ou componentes de sua estrutura,

e os testes moleculares, que detectam sequências específicas de ácidos nucleicos por intermédio de técnicas de biologia molecular. Os exames sorológicos, considerados exames presuntivos, ainda carecem de sensibilidade e especificidade para uso rotineiro (BETHLEM et al., 1995; PALOMINO, LEÃO & RITACCO, 2007).

Apesar dos avanços tecnológicos e dos esforços na tentativa da descoberta de novas técnicas diagnósticas, ainda não existe um método de fácil execução, rápido e que apresente alta sensibilidade e especificidade, e seja capaz de diferenciar pacientes com tuberculose ativa daqueles indivíduos com tuberculose latente e/ou acometidos por outras doenças.

3.2.1 Diagnóstico Clínico

As manifestações clínicas da tuberculose são variáveis e dependem de alguns fatores relacionados ao hospedeiro como a idade, estado nutricional, estado imune, co-morbidades, vacinação por BCG e a história de contato prévio com pacientes portadores da doença. Essas manifestações constituem dados importantes, que conduzem à formulação de hipóteses acerca do diagnóstico (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000).

Dependendo da evolução da doença, o paciente pode ser assintomático ou manifestar-se clinicamente com tosse, febre, perda de peso, sudorese noturna e inapetência. A febre apresenta uma variação ao longo do dia. Geralmente, é baixa ou normal durante a manhã, aumentando gradativamente até o final da tarde. À noite, a temperatura volta ao normal e é acompanhada de sudorese. A tosse está presente na maioria dos casos. Pode ser inicialmente uma tosse seca, e com a progressão da doença, evolui para uma expectoração purulenta. Não raro, o escarro pode estar acompanhado de sangue, o que evidencia um comprometimento de vasos pulmonares. O volume de sangramento é variável e não indica necessariamente tuberculose ativa (DUNLAP et al., 2000; GARAY, 2004).

O tempo de sintomas é passível de variação, mas a persistência de tosse por mais de três semanas é classicamente descrita como um importante fator preditivo de TB

pulmonar em atividade nos adultos. Essa persistência da tosse caracteriza o denominado sintomático respiratório (BRASIL, 2004).

3.2.1.1 A busca do Sintomático Respiratório enquanto estratégia para detecção de casos de tuberculose

A busca de Sintomáticos Respiratórios (SRs) caracteriza-se como uma importante estratégia para a detecção de novos casos de TB. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose define como Sintomático Respiratório (SR) toda pessoa maior de 15 anos com tosse e expectoração por três semanas ou mais (BRASIL, 2002b).

Nesse sentido, Ruffino–Netto (1987) alerta para o fato de que é preciso, portanto, estabelecer a tradução da percepção do sintoma da tosse em SR, que pode ter uma dimensão cultural nas distintas classes sociais. Enquanto esse sintoma pode ser um sinal de alerta significativo para certas classes sociais, poderá não representar significado algum para outras, a não ser que seja acompanhado de outros sintomas incapacitantes para o trabalho, como febre, emagrecimento, dor torácica, hemoptise.

Em, 1980, Arantes e Ruffino demonstraram a importância do SR no seu papel de transmissor da doença. Apesar de a tosse estar presente em várias outras doenças, a expectoração é o ponto de partida para investigação da TB (FLORES-CARDOSO; COSTA-PASSOS E RUFFINO-NETTO, 1989). A detecção precoce de casos bacilíferos, ou seja, os indivíduos infectantes, o mais rápido possível, é de grande importância, de forma que limite a transmissão da doença. Em países de alta prevalência da doença, como o Brasil, estima-se que um portador da forma pulmonar bacilífera possa infectar de 10 a 15 indivíduos em um ano, tornando-se a fonte de contágio mais importante (STYBLO, 1984).

Apesar de alguns pacientes serem diagnosticados com base apenas na forte suspeita clínica e resposta ao tratamento anti-TB, sem a confirmação bacteriológica, é recomendado que o diagnóstico clínico seja confirmado com o auxílio de exames complementares (CHAN et al., 2000).

3.2.2 Diagnóstico Radiológico

O exame radiográfico do tórax constitui uma importante ferramenta no diagnóstico da tuberculose, portanto justificando sua utilização nos indivíduos sintomáticos respiratórios, nos suspeitos de serem portadores de tuberculose extrapulmonar, nos portadores de infecção pelo HIV e nos contactantes (intradomiciliar ou extradomiciliar) de pacientes com tuberculose pulmonar (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000; BRASIL, 2004). A maioria dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresenta alterações radiográficas sugestivas.

Duas situações distintas devem ser consideradas: a tuberculose primária e a tuberculose pós-primária (ou secundária), uma vez que estas se manifestam clínica e radiologicamente, de diferentes formas (DUNLAP et al., 2000). A tuberculose pós-primária é, praticamente, exclusiva do adulto, tendo localização preferencial pelos segmentos dorsais dos lobos superiores e pelos segmentos apicais dos lobos inferiores. Quanto maior a extensão da doença maior a chance de o paciente apresentar doença cavitária. Canetti, em estudo realizado em 1965, reportou que a população bacilífera presente nas lesões de um paciente com tuberculose pulmonar varia grandemente, dependendo da morfologia lesional. O número de bacilos em lesões nodulares sólidas varia de 10^2 a 10^4 , enquanto em lesões cavitárias, a população de bacilos varia de 10^7 a 10^9 .

Nas situações em que as apresentações radiográficas são consideradas atípicas principalmente em pacientes infectados pelo HIV/AIDS com esfregaço negativo e cultura positiva, a tomografia computadorizada do tórax contribui para demonstrar alterações não visualizadas através da radiografia. Comparada com o exame radiográfico do tórax, a tomografia computadorizada fornece uma informação mais precisa sobre a extensão e a distribuição da doença, e a presença de cavidade que pode não ser visualizada no exame radiográfico do tórax (MATSUOKA et al., 2004).

Além disso, o método possui um fator limitante, já que várias doenças pulmonares produzem lesões semelhantes à TB. Dessa forma, o exame radiográfico de tórax não confirma nem descarta o diagnóstico, apenas indica a extensão da doença. (GARAY, 2004).

3.2.3 Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico bacteriológico da tuberculose é, reconhecidamente, considerado como o método prioritário quer para o diagnóstico, quer para o controle do tratamento da tuberculose. Esse é confirmado somente através da presença do agente etiológico no espécime clínico que consiste na detecção, isolamento e identificação da micobactéria a partir de espécimes clínicos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; TENOVER et al., 1993).

3.2.3.1 Baciloscopia

A baciloscopia consiste na visualização microscópica do bacilo da TB após fixação em lâmina e coloração específica do material a ser analisado. É considerado um método de diagnóstico de fácil execução, rápido, barato e utilizado pela maioria dos serviços de saúde pública. É capaz de fornecer uma estimativa da quantidade de bacilos na amostra, fundamental às medidas de controle da doença (DAMATTO et al., 1983). Dentre as técnicas utilizadas para coloração do bacilo, a mais utilizada é a de Ziehl-Neelsen que se baseia na capacidade das micobactérias de reterem o corante (fucsina básica ou fluorocromo) sem sofrer descoloração com álcool e ácido devido à grande quantidade de ácidos micólicos que possui na sua parede celular, o que permite a identificação do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR).

A baciloscopia apresenta boa especificidade em áreas de alta taxa de prevalência (PERKINS, 2000), porém sua sensibilidade é limitada, pois para visualização do bacilo álcool-ácido resistente são necessário na amostra quantidades acima de 5.000-10.000 bacilos/mL (HOBBY et al., 1973; TOMAN, 1980). É considerada muito sensível para a detecção de pacientes bacíferos, na faixa de 30 a 80% (GEBRE et al., 1995; PETERSON et al., 1999; GOESSENS et al., 2005), porém pouco sensível para o diagnóstico de pacientes paucibacíferos (BRODIE; SCHLUGER, 2005).

Dentre as limitações da técnica, destaca-se o fato de o resultado apenas identificar o microrganismo como BAAR, sendo incapaz de diferenciar as espécies de micobactérias (RIBEIRO et al., 1995). Além disso, um fator de grande importância na acurácia do exame microscópico e conseqüentemente no resultado final do

diagnóstico é a orientação fornecida aos pacientes pelos profissionais de saúde quanto aos procedimentos para coleta de escarro. Uma orientação inadequada durante a coleta do espécime clínico pode prejudicar o diagnóstico da doença.

O diagnóstico do restante dos casos só é possível mediante a utilização de métodos mais sensíveis como a biologia molecular e a cultura.

3.2.3.2 Cultura

A cultura para micobactérias é considerada uma técnica fundamental e de grande eficácia no diagnóstico da TB, sendo por isso considerada o padrão – ouro para o diagnóstico da doença (TORTOLI et al., 1999; PALOMINO-LEÃO-RITACCO, 2007). Em geral, a sensibilidade da cultura é de 70% para pacientes sem a doença cavitária e chega a até 96% em pacientes com a lesão cavitária (GREENBAUM, 1980). Em pacientes com baciloscopia negativa a sensibilidade da cultura varia de 80-85% (STAGER et al., 1991; MORGAN et al., 1983; ROBERTS et al., 1983), com especificidade de aproximadamente 98% (ICHIYAMA et al., 1993; SCHIRM et al., 1995). Além disso, a cultura permite a identificação das espécies, avaliação de novas drogas e ou esquemas terapêuticos (o que explica sua ampla utilização em ensaios clínicos); tipagem molecular do *M. tuberculosis*; determinação de resistência do *M. tuberculosis* aos quimioterápicos e análise de virulência (DUNLAP, 2000; PALOMINO, 2005).

O processo de digestão e descontaminação do espécime clínico compreende a etapa inicial para realização da cultura. Após essa etapa, a amostra é muitas vezes concentrada por intermédio da centrifugação e, por fim, inoculada no meio de cultura de escolha.

Existem disponíveis vários meios de cultura para o isolamento das micobactérias. O meio de cultura mais amplamente utilizado para isolamento de micobactérias é o Löwenstein-Jensen (LJ) e o Ogawa, à base de ovo, contendo glicerol como fonte de carbono e asparagina como fonte de nitrogênio. Nesses meios, são necessárias entre 3 e 6 semanas de incubação para o isolamento e detecção do *M. tuberculosis*

(KENT & KUBICA, 1985). Nos meios sólidos à base de ovo, o crescimento é levemente melhor que nos meios à base de ágar.

Um estudo realizado na Região Metropolitana da Grande Vitória – Espírito Santo, mostrou que houve um incremento de 23,4% no diagnóstico bacteriológico, a partir do momento em que a cultura pelo método de Ogawa-Kudoh foi introduzida nos laboratórios das prefeituras como técnica de rotina complementar ao uso da baciloscopia (RIBEIRO et al., 2004).

Outros meios de cultura à base de Ágar, tais como o Middlebrook 7H10 e 7H11, proporcionam o crescimento mais rápido do *M. tuberculosis* do que os meios à base de ovos (2 a 3 semanas), e são indicados preferencialmente para a determinação das UFC/mL em espécimes clínicos (Cultura quantitativa) (KENT & KUBICA, 1985; BASS et al., 1990; DIETZE et al., 2001). Menor tempo de crescimento é alcançado com a utilização de meios líquidos, como os Middlebrook 7H9 e 7H12 (SOMOSKOVI & MAGYAR, 1999). Porém, a utilização desses meios para o isolamento primário a partir de espécimes não estéreis requer a adição de antibióticos para conter o crescimento de outros microrganismos contaminantes, evitar a contaminação da cultura, possibilitando a observação da morfologia das colônias (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000).

Além dos meios sólidos, existem ainda os meios líquidos utilizados em sistemas semi - automatizados ou automatizados que têm diminuído consideravelmente o tempo de detecção do crescimento micobacteriano (HANNA, 2004). Esses sistemas avaliam o crescimento do microrganismo através de métodos radiométricos ou não-radiométricos.

O método radiométrico BACTEC TB 460 consiste em um sistema semi-automatizado (Becton Dickinson Instrument System) baseado na detecção de CO₂ liberado pelas micobactérias devido à utilização do ácido palmítico marcado com ¹⁴C presente no meio de cultura (BETHLEM et al., 1995). O método BACTEC proporciona resultados em menor tempo que a cultura convencional, levando em média 10 a 14 dias para revelar a presença de micobactérias, dependendo do número presente na amostra clínica analisada. A sensibilidade e a especificidade são semelhantes àquelas obtidas com a cultura tradicional (AGY et al., 1989; ELLNER et al., 1988; BLOOM,

1992). Esse sistema também pode ser usado para a diferenciação de *M. tuberculosis* de outras micobactérias e para a realização de testes de sensibilidade (PALACI et al., 1996; SCARPARO et al., 2002). Apesar de ser um sistema de detecção rápida de micobactéria em espécime clínico, esse método está sendo descontinuado. Uma das limitações é a utilização de compostos radioativos que, requer um equipamento relativamente caro, limitando o seu uso aos laboratórios de referência (CONVILLE et al., 1989; HUBNER et al., 1993).

Outros métodos baseiam-se na detecção não radiométrica do crescimento micobacteriano. O sistema MGIT™ (*Mycobacteria* Growth Indicator Tube, BBL®, Becton Dickinson, Cockeysville, MD) tem como princípio a detecção do consumo de oxigênio (O₂) por fluorescência, como indicador de crescimento micobacteriano. O tubo BBL MGIT™ contém meio Middlebrook 7H9 modificado e possui uma base de silicone impregnada com um composto fluorescente sensível à presença de oxigênio, o rutênio. Essa substância é o indicador do crescimento da micobactéria, cujo metabolismo causa a diminuição da concentração de oxigênio no meio, resultando na emissão de fluorescência. A fusão da tecnologia BACTEC com o MGIT resultou no sistema BACTEC™ MGIT™ 960 (BM960, BECTON DICKINSON MICROBIOLOGY SYSTEMS), que tem a capacidade de incubação de até 960 culturas, com monitoramento contínuo a cada sessenta minutos. O tempo de detecção do crescimento bacteriano é comparável ao obtido pelo BACTEC 460 TB (CRUCIANI et al., 2004). Dentre os fatores ainda limitantes da utilização desse método, destaca-se o custo elevado do equipamento e dos materiais para realização dos procedimentos e a alta taxa de contaminação encontrada nas culturas de micobactérias devido à presença de dextrose na composição do meio.

Esses sistemas permitem diferenciar bactérias do Complexo *M. tuberculosis* de outras micobactérias, além de também realizar testes de sensibilidade.

Os testes de sensibilidade são recomendados principalmente nas situações onde há casos de falência e retratamento da doença, e, ainda, na investigação dos casos de suspeita de resistência primária (BRASIL, 2008).

Para a realização do teste de sensibilidade, é necessário o crescimento obtido a partir da cultura e o resultado é obtido em média 20 a 28 dias após a identificação do

M. tuberculosis, quando se utiliza a metodologia clássica, ou seja, o método das proporções em meio de cultura LJ (ARDITO et al., 2001).

Outras metodologias, que utilizam tecnologia mais avançadas como os métodos automatizados, dentre eles o BACTEC/MGIT 960® também podem ser utilizados. Uma das vantagens da utilização desse método é o resultado de susceptibilidade às drogas do tratamento mais precocemente, entretanto, demandam um custo mais elevado (BRASIL, 2004).

Alternativas também têm sido propostas, como os testes moleculares, porém são metodologias mais caras sendo mais utilizadas em centros de pesquisa e unidades de referência.

3.2.3.3 Fatores relacionados à contaminação das culturas de micobactérias

Alguns aspectos operacionais ainda limitam a utilização da cultura para o diagnóstico da tuberculose: o primeiro é o longo tempo para obtenção do resultado do exame, o qual pode ser parcialmente superado pelas novas tecnologias bacteriológicas; o segundo diz respeito à contaminação da cultura com outros microrganismos, como bactérias e fungos, presentes na amostra.

Essa contaminação nas culturas de escarro com outros organismos afeta o diagnóstico da doença, principalmente, quando o paciente é paucibacilífero e apresenta lesões iniciais (CORNFIELD et al., 1997; HANNA et al., 1999; BUIJTELS & PETIT, 2005). Nesse caso, é necessário eliminar a microbiota associada que cresce mais rapidamente que as micobactérias, contaminando o meio de cultura e impedindo a multiplicação dos bacilos (KENT & KUBICA, 1985).

Uma ferramenta essencial para o isolamento da micobactéria são as etapas de digestão e descontaminação dos espécimes clínicos não estéreis, como o escarro.

Segundo o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, do Ministério da Saúde (2008) para isolamento e identificação de micobactérias, existem vários métodos descritos para minimizar a contaminação das culturas processadas de sítios não estéreis. Os mais utilizados são o método de

Petroff modificado, que utiliza NaOH 4% como agente de fluidificação/descontaminação e, o método de N-acetyl- L- cisteína / NaOH (NALC / NaOH), que utiliza como agente mucolítico o N-acetil-L-cisteína (NALC) e como agente descontaminante o NaOH a 2%. O método também utiliza o Citrato de sódio a 1,45% com a função de seqüestrar os íons de metais pesados que uma vez presentes nas amostras clínicas podem inativar a NALC.

O método de Petroff apesar de ser o recomendado pelo Ministério da Saúde para isolamento do bacilo e ser de baixo custo, utiliza uma concentração final de NaOH a 2%, tornando-se um procedimento altamente drástico, enquanto o método de N-acetyl- L- cisteína / NaOH (NALC / NaOH) utiliza uma concentração final de NaOH a 1%. Além disso, essa solução mucolítica/descontaminante é compatível com todos os meios de cultura, sendo recomendado para todas as amostras clínicas, principalmente as paucibacilares. É também o recomendado para descontaminar amostras que serão semeadas em sistemas automatizados.

Em muitos laboratórios clínicos, a concentração final padrão do hidróxido de sódio utilizado é 1% para o processamento do espécime. Em países em desenvolvimento, a concentração final de hidróxido de sódio varia entre 1,25% - 1,5% com o objetivo de diminuir a contaminação das culturas (KENT & KUBICA, 1985).

Além desses, um método amplamente utilizado que permite a conservação do espécime clínico em até 8 dias mantendo a viabilidade da micobactéria, é o método que utiliza o cloreto de cetilpiridínio / NaCl (LUMB et al, 2006; PARDINI et al, 2005; BOBADILLA-DEL-VALLE et al, 2003). Esse método é frequentemente utilizado para o transporte de espécimes clínicos que foram expostos à temperatura ambiente por mais de 48 horas (WHO, 2003) e evita que a microbiota contaminante que cresce mais rapidamente que as micobactérias se proliferem em grande quantidade. Entretanto, uma de suas limitações é a quantidade de etapas necessárias para a descontaminação da amostra antes de ser inoculada no meio de cultura (SMITHWICK, 1975).

Apesar da utilização desses métodos de descontaminação para amostras de sítios não estéreis, vários estudos evidenciam altas taxas de contaminação nas culturas

de micobactérias de pacientes com tuberculose pulmonar (HANNA et al., 1999; TORTOLI et al., 1999; KANCHANA et al., 2000; SCARPARO et al., 2002).

Segundo estudo realizado por Kanchana e colaboradores (2000) e Piersimoni e colaboradores (2001), o uso de procedimentos de descontaminação com concentrações mais elevadas de NaOH (3% ou 4%) levam tanto a uma diminuição das taxas de contaminação bacteriana quanto a uma diminuição nas taxas de detecção micobacteriana. Essa diminuição na detecção pode ser atribuída a elevada concentração de NaOH presente na amostra. Entretanto, ambos os estudos não podem ser considerados conclusivos, pois não compararam o uso de duas concentrações diferentes de NaOH.

De acordo com o Manual da OPAS (2008) o índice aceitável de contaminação de culturas deve ser entre 3% - 5%. Se o índice de culturas contaminadas é inferior a 3% assume-se que a descontaminação é excessiva e pode estar matando as micobactérias existentes naquela amostra, principalmente para amostras paucibacilares, além de micobactérias não causadoras de tuberculose (PALOMINO, LEÃO, RITACCO, 2007).

Diversos fatores podem estar relacionados à contaminação das culturas por outros organismos contaminantes, como a coleta do espécime clínico, o seu transporte e armazenamento. Esses fatores também podem contribuir para redução da viabilidade das micobactérias no espécime (KANCHANA et al., 2000; LUMB et al., 2006) . Uma refrigeração inadequada durante o transporte das amostras pode criar condições favoráveis para a multiplicação de bactérias de crescimento rápido que inviabilizarão o diagnóstico da doença.

Segundo Rao e colaboradores (1966) uma possível fonte de contaminação observada nas culturas de micobactérias pode ser a microbiota bacteriana concomitante presente nos espécimes clínicos coletados principalmente durante a noite. Esses contaminantes são compostos predominantemente por fungos e esporos, que são possivelmente mais resistentes à descontaminação das amostras.

Isso se deve ao fato de a microbiota da cavidade oral representar um ambiente favorável para o crescimento microbiano, por ser colonizada por uma microbiota

mista e inespecífica. Segundo o Manual do Ministério da Saúde (2008), é necessário que o paciente faça uma boa higienização bucal antes da coleta do escarro, para reduzir a contaminação por outros microrganismos existentes na microbiota oral.

Diante desses fatores relacionados às elevadas taxa de contaminação observada nas culturas dos pacientes com TB reforça-se sobremaneira a adoção de práticas e “bons hábitos” clínicos e laboratoriais, tendo em vista a tendência natural ao relaxamento dos aspectos básicos de atitudes e comportamento do ser humano. No Brasil, devido às deficiências principalmente da rede pública de saúde, e aos problemas socioeconômicos acumulados nas últimas décadas, observa-se uma enorme deficiência no que tange à questão capacitação de recursos humanos o que supostamente deve refletir na qualidade dos procedimentos de coleta de escarro dos pacientes sintomáticos respiratórios e conseqüentemente na eficiência dos exames bacteriológicos.

3.2.3.4 Utilização de anti-sépticos bucais na prevenção de microrganismos contaminantes da cavidade oral

A cavidade bucal humana é habitada por inúmeros organismos. Uma estratégia amplamente utilizada em outras áreas para minimizar a presença desses organismos contaminantes, como bactérias e fungos, e que fazem parte da microbiota oral, é o uso de anti-sépticos como complemento à higienização bucal.

Entre os compostos ativos mais utilizados em anti-sépticos bucais está a clorexidina (CHX) e o cloreto de cetilpiridínio (CPC). A clorexidina tem se mostrado um excelente agente antimicrobiano atuando com amplo espectro de atividade contra bactérias gram - positivas e gram - negativas (GROSSMAN et al., 1986; DENTON, 1991; MCDONNELL & RUSSELL, 1999). Ela é altamente eficaz e em geral utilizada como padrão para avaliar a potência de outros agentes. Atua na desorganização geral da membrana celular e inibição específica de enzimas da membrana.

O cloreto de cetilpiridínio atua reduzindo significativamente a população de bactérias gram-positivas e leveduras na cavidade oral (BARROS et al., 1998). Esse anti-séptico pertence ao grupo dos tensoativos catiônicos apresentando propriedades

detergentes e bactericidas. Seu mecanismo de ação está relacionado a alterações na permeabilidade da membrana celular da bactéria, que favorece a lise e diminui o metabolismo celular.

Alguns estudos demonstram a resistência do *M. tuberculosis* e de outras espécies de micobactérias a várias substâncias químicas, incluindo os anti-sépticos. Esse alto grau de resistência pode ser atribuído à estrutura de sua membrana (McDONNELL & RUSSEL, 1999; RIKIMARU et al., 2000; PARDINI et al., 2005). Portanto, uma estratégia que pode ser utilizada para diminuir a contaminação das culturas de micobactérias pela microbiota oral do paciente é o uso desses anti-sépticos bucais antes da coleta do escarro. Entretanto, não existem estudos que demonstram o efeito desses anti-sépticos bucais na redução da taxa de contaminação de culturas de amostras de pacientes com suspeita clínica ou radiográfica de TB.

Devido a elevada taxa de contaminação nas culturas dos pacientes observada em nosso laboratório, e corroborados por outros autores (HANNA et al., 1999; TORTOLI et al., 1999; KANCHANA et al., 2000; SCARPARO et al., 2002) torna-se evidente a necessidade de avaliação de fatores que possam interferir no exame bacteriológico de escarro e de adoção de novas metodologias ou estratégias para diminuir a taxa de contaminação das culturas dos pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar.

Material e Métodos

4 Material e Métodos

4.1 Local e Modelo do Estudo

Este estudo foi caracterizado como um ensaio clínico, prospectivo, randomizado e controlado, e conduzido no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo, para avaliação do uso de anti-sépticos bucais na redução da contaminação de culturas de micobactérias de pacientes sintomáticos respiratórios. Todas as atividades realizadas neste laboratório foram conduzidas obedecendo às boas práticas clínicas, laboratoriais e de biossegurança.

4.2 Seleção dos Pacientes

No período de dezembro de 2007 a dezembro de 2008, foram selecionados, pacientes sintomáticos respiratórios com suspeita clínica e/ou radiográfica de TB, para participar do estudo. Esses pacientes foram selecionados em duas Unidades Básicas de Saúde da Região Metropolitana da Grande Vitória - ES (Vitória e Serra). Os pacientes atendidos na Unidade Básica de Saúde de Vitória, após aceitarem participar do estudo e assinarem o termo de consentimento, foram encaminhados ao Centro de Pesquisa Clínica - CPC do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, em Vitória, onde realizaram a coleta dos espécimes.

Os pacientes selecionados pela Unidade Básica de Saúde da Serra-ES foram convidados a participar do estudo e após assinarem o termo de consentimento, foram submetidos à realização da coleta do espécime clínico no mesmo local.

Para inclusão neste estudo, foram selecionados os pacientes que obedeciam aos seguintes critérios:

Critérios de Inclusão:

- Adultos, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 80 anos,

- Pacientes com suspeita clínica ou radiográfica de tuberculose pulmonar,
- Sorologia negativa para HIV,
- Concordar e estar apto a dar o consentimento para participação no estudo,
- Capacidade de produzir escarro (volume mínimo de 5 mL),
- Ausência de história pregressa de tuberculose, e
- Não ter iniciado o tratamento com as drogas anti-tuberculose no período mínimo de até 30 dias,

Critérios de Exclusão:

- Foram excluídos do estudo os pacientes que não coletaram amostras de escarro ou não foram capazes de produzir o escarro para segunda coleta.

4.3 Coleta dos Dados

Os pacientes que aceitaram participar desse estudo responderam a um questionário padronizado (ANEXO II) realizado pelos pesquisadores do estudo que visava à caracterização dos grupos do estudo nas seguintes variáveis:

- I. Variáveis sócio-demográficas,
- II. Variáveis que pudessem interferir no resultado do exame de cultura,
- III. Variáveis consideradas como fatores de risco para tuberculose pulmonar.

Também foram coletadas amostras de sangue para posterior investigação de infecção pelo vírus HIV. Essas amostras foram coletadas após consentimento do paciente. O diagnóstico da infecção pelo vírus HIV foi investigado através da pesquisa de anticorpos no soro do paciente. O método utilizado pelas Unidades de

Saúde foi o método de ELISA (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands). Entretanto, como os resultados do teste HIV fornecidos pelas Unidades de Saúde levavam em média de 1 a 2 meses para serem liberados, para todos os pacientes que consentiram na realização do exame, foi utilizado o teste rápido (NDI-UFES) para diagnóstico de infecção pelo HIV.

Após o diagnóstico clínico e laboratorial, os pacientes com tuberculose iniciaram o tratamento com as drogas anti-tuberculose e foram acompanhados mensalmente até o término de 6 meses do tratamento. Visitas mensais foram realizadas pelos pacientes para recebimento do medicamento e consulta médica. Os pacientes que não compareceram às Unidades de Saúde por algum motivo, receberam o tratamento supervisionado em suas residências, realizado por enfermeiros.

4.4 Grupos de Estudo

Os pacientes foram arrolados formalmente no estudo, após preencherem todos os critérios de elegibilidade e assinarem um termo de consentimento pós-informação (ANEXO I).

Esses pacientes que aceitaram participar do estudo receberam um código de randomização gerado aleatoriamente para cada grupo através de um programa de computador.

No primeiro dia da coleta, o paciente foi orientado a realizar a higiene bucal com água para diminuir a possível contaminação com resíduos alimentares e reduzir a ação de drogas que pudessem inibir o crescimento das micobactérias. A amostra desse paciente foi classificada como CONTROLE (**GRUPO CONTROLE**).

No dia seguinte, o mesmo paciente foi orientado a retornar à Unidade Básica de Saúde para a segunda coleta do escarro (o paciente foi controle dele mesmo). Nesse momento, o paciente foi selecionado aleatoriamente para um dos grupos abaixo que realizaram o bochecho com uma das soluções de anti-sépticos (**GRUPO INTERVENÇÃO**):

- **GRUPO CHX (clorexidina)** – foi constituído por 59 pacientes que realizaram a higienização oral com solução de gluconato de clorexidina na concentração padrão recomendada a 0,12% (solução comercial de Periorgard – Colgate Palmolive). A anti-sepsia foi realizada antes da coleta do escarro, durante 1 minuto, utilizando um volume de 10mL do anti-séptico CHX (**FIGURA 2**).
- **GRUPO CPC (cloreto de cetilpiridínio)** – foi constituído por 61 pacientes que realizaram a higienização oral com solução de cloreto de cetilpiridínio na concentração padrão recomendada a 0,05% (solução comercial de Colgate Plus - Colgate Palmolive). A anti-sepsia foi realizada antes da coleta do escarro, durante 1 minuto, utilizando um volume de 10mL do anti-séptico CPC (**FIGURA 2**).

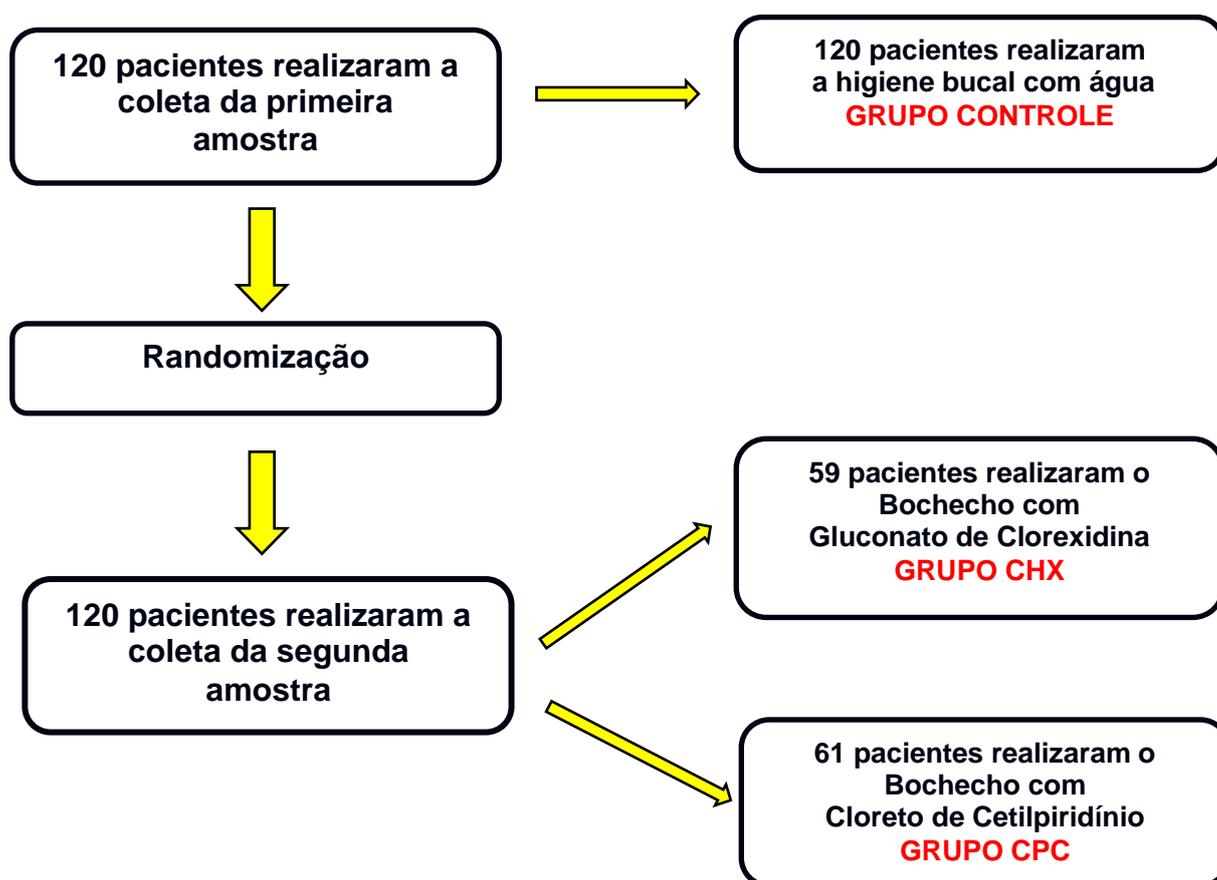


Figura 2 – Fluxograma da logística operacional da coleta das amostras de escarro.

4.5 Coleta e Transporte das Amostras

A coleta do escarro foi realizada por uma equipe de profissionais treinados. Foram realizadas visitas diárias nas Unidades Básicas de Saúde de Vitória e da Serra para busca ativa dos pacientes sintomáticos respiratórios. Inicialmente, os pacientes foram avaliados clinicamente pelos médicos, e os que preencheram os critérios de inclusão e assinaram o termo de consentimento esclarecido foram submetidos ao preenchimento da ficha epidemiológica do protocolo de pesquisa (ANEXO II) e à coleta de escarro para os procedimentos laboratoriais.

Para realização dos exames bacteriológicos os pacientes foram orientados a coletar os escarros em recipientes de plástico estéreis, não reaproveitáveis. Nesse estudo utilizamos 2 amostras de escarro espontâneo, coletadas em dias consecutivos pela manhã, em jejum e após higiene bucal. Essas coletas foram anteriores ao início do tratamento com as drogas anti-tuberculose.

Após a coleta, as amostras foram refrigeradas a 4°C e encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Micobacteriologia do NDI-UFES onde foram realizados os procedimentos bacteriológicos.

4.6 Processamento das Amostras

Realizada a randomização dos pacientes nos grupos CHX ou CPC, as amostras de escarro foram submetidas à digestão e descontaminação com N-acetil-L-cisteína (NALC) a uma concentração final de 0,5% em solução de NaOH 2,0% / Citrato de sódio 1,45% (**concentração final de NaOH 1,0% / Citrato de sódio 0,75%**) por 15 minutos, à temperatura ambiente.

Após a descontaminação, foi adicionado a todas as amostras, tampão fosfato até um volume final de 50 mL. As amostras foram centrifugadas a 4000 x g, por 15 minutos, a 4° C. O sedimento formado foi ressuspenso em 2,0 mL de tampão fosfato (KENT & KUBICA, 1985) para posterior realização do esfregaço e da cultura (**FIGURA 3**).

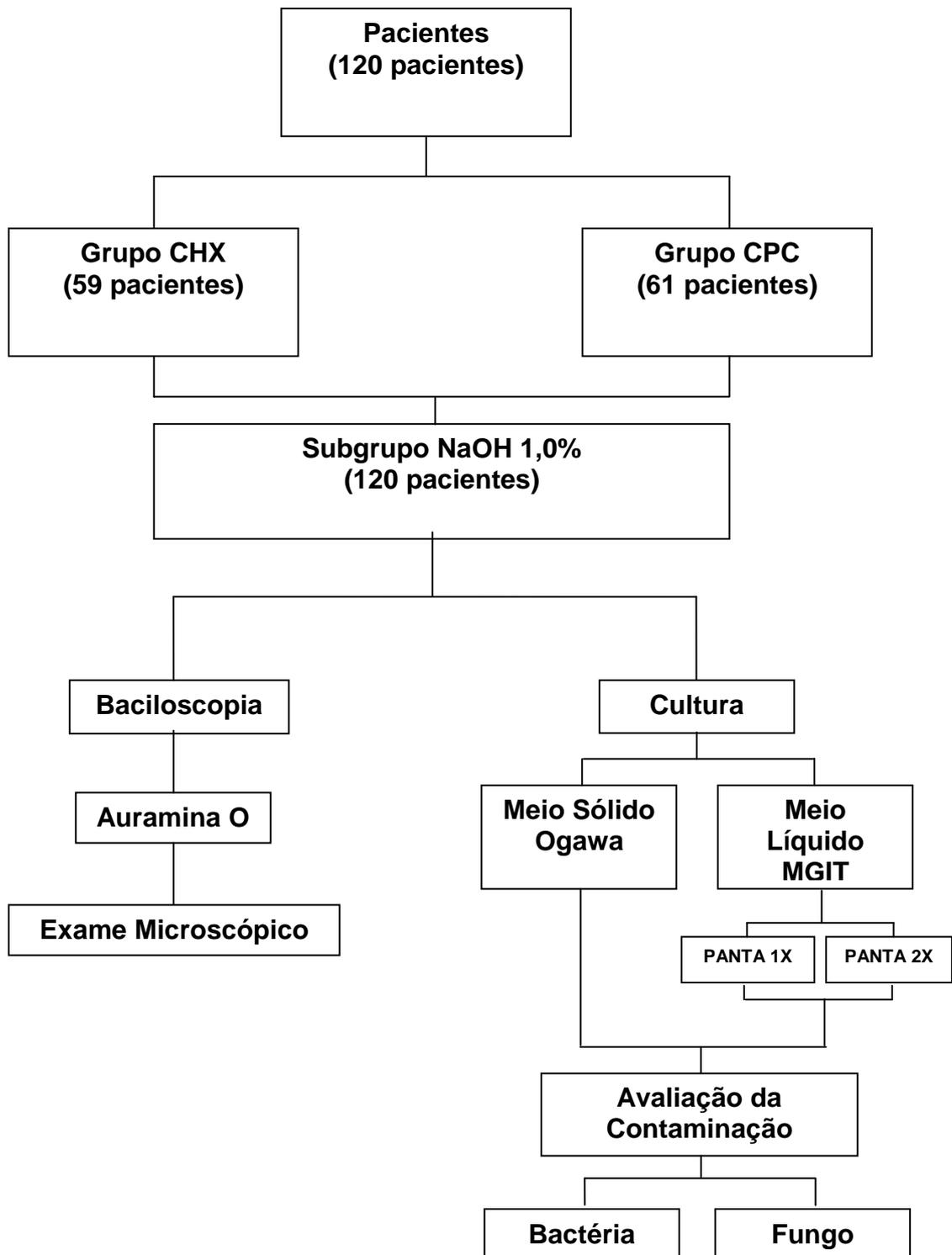


Figura 3 – Fluxograma dos procedimentos realizados após o processamento das amostras.

4.7 Baciloscopia

Para a realização do esfregaço uma alíquota de 30µL do sedimento foi distribuída sobre a superfície de uma lâmina de vidro. O mesmo foi submetido ao exame microscópico para verificação do bacilo álcool ácido resistente (BAAR) utilizando o método de coloração com Auramina O (Remel Laboratories, Lenexa, Kans) de acordo com os procedimentos padrões (KENT e KUBICA, 1985; BRASIL, 2005).

4.8 Cultura Qualitativa em meio sólido Ogawa para isolamento do *M. tuberculosis* e detecção de outros organismos contaminantes

Para a análise das amostras de ambos os grupos foram realizadas culturas em meio sólido (Ogawa). Uma alíquota do sedimento (200µL) foi inoculada no meio Ogawa, incubado a 37° C e as culturas avaliadas semanalmente por um período máximo de 6 semanas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificado utilizando os padrões de interpretação publicados pelo CDC (CENTER OF DISEASES CONTROL, 1985).

Uma cultura foi considerada contaminada em meio sólido quando foi observada macroscopicamente na superfície a presença de microrganismos contaminantes (como fungos ou outras bactérias) ou quando o meio de cultura foi destruído por outras bactérias. Para as culturas que tinham a superfície parcialmente contaminada, observações a cada dois dias foram realizadas até o crescimento de micobactérias no meio ou até o período máximo de 6 semanas.

Além disso, para confirmação do resultado de cultura positiva para micobactérias ou contaminação, exames microscópicos foram realizados utilizando os procedimentos padrões de coloração da técnica de Ziehl – Neelsen.

Após seis semanas de incubação, as culturas que não apresentaram crescimento de micobactérias foram consideradas negativas (KENT e KUBICA, 1985).

4.9 Cultura Qualitativa em meio líquido MGIT BACTEC 960® para isolamento do *M. tuberculosis* e detecção de outros organismos contaminantes

Um volume de 500µL do sedimento foi inoculado em meio líquido MGIT BACTEC 960 TB® (BACTEC TB System Becton Dickinson, Sparks, Md, 1996).

Esse sedimento foi inoculado após a adição de um volume de 800 µL de uma mistura de antibióticos (PANTA) e do suplemento OADC ao meio MGIT. O suplemento OADC (que contém ácido oléico, albumina, dextrose e catalase) é adicionado em cada tubo MGIT para fornecer substâncias essenciais ao rápido crescimento das micobactérias.

Para reconstituição do **PANTA – na concentração 1X** um volume de 15 mL de suplemento foi acrescentado a essa mistura de antibióticos (que contém anfotericina B, polimixina, ácido nalidíxico, trimethoprim e azlocilina), conforme recomendações do fabricante (Manual do BACTEC TB System Becton Dickinson, Sparks, Md, 1996).

Para uma segunda análise da taxa de contaminação na cultura em meio líquido MGIT, foi verificado se a adição de **PANTA – na concentração 2X** ajudaria a diminuir a taxa de microorganismos contaminantes nas amostras de escarro dos pacientes. Para isso adicionamos ao frasco liofilizado de PANTA um volume menor, equivalente a 7,5 mL de suplemento (PANTA – 2X).

Após inoculação dos espécimes, os tubos MGIT foram introduzidos no sistema BACTEC™ MGIT™960 e incubados a 37°C. O sistema monitora continuamente os tubos a cada 60 minutos quanto ao aumento de fluorescência. A análise de fluorescência é utilizada para determinar se o tubo é positivo, ou seja, se a amostra teste contém organismos viáveis. Um tubo positivo contém aproximadamente 10⁵ a 10⁶ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) (Manual do BACTEC TB System Becton Dickinson, Sparks, Md, 1996).

Todas as culturas positivas foram confirmadas com a realização de um esfregaço para verificação do BAAR ou de outros microorganismos contaminantes. Para as culturas contaminadas foi realizada uma coloração pelo método de Ziehl-Neelsen e cultivo em placas de ágar-sangue para verificação do organismo presente. Ao

completarem o período máximo de 42 dias, os tubos que não apresentaram crescimento foram removidos do equipamento como negativos e foram esterilizados antes de serem descartados.

4.10 Identificação do *Mycobacterium tuberculosis* através de métodos fenotípicos

Para todas as culturas puras que apresentaram crescimento de micobactéria em meio Ogawa e no meio MGIT foi realizada uma análise fenotípica com base nas seguintes características: tempo de crescimento, aspecto morfológico e pigmentação das colônias.

Essas culturas também foram avaliadas quanto à sensibilidade ao ácido *p*-nitrobenzóico (500 μ g/mL) e resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (2 μ g/mL) (KENT & KUBICA, 1985).

4.11 Tamanho da Amostra

A amostra foi calculada considerando o nível de significância do teste de McNemar monocaudal de 0,05 e poder de 80% para detectar diferença entre a taxa de contaminação no grupo controle em relação ao grupo de intervenção de 10%, com um percentual de pares discordantes de aproximadamente 12%. Para essa estimou-se um total de 59 pares. Neste estudo foi realizada a randomização de 59 pares de SR para cada grupo de intervenção.

4.12 Processamento de Dados

Para posterior análise, os dados coletados dos questionários foram armazenados em uma planilha eletrônica Microsoft Excel (Microsoft, WA, USA). Posteriormente as análises foram realizadas utilizando-se o programa STATA 9.0 (Stata Corporation,

College Station, Estados Unidos), para identificar os fatores relacionados à discordância entre os testes e o desfecho avaliado na população do estudo.

4.13 Análise Estatística

Técnicas de estatística descritiva foram utilizadas inicialmente, através da análise das distribuições de frequências. As características sócio-demográficas dos grupos de estudo foram comparadas. Para variáveis categóricas utilizamos o χ^2 . Para análise de dados pareados, por exemplo, a taxa de contaminação observada entre as amostras dos pacientes do grupo controle em relação às do grupo de intervenção, foi utilizado o teste de McNemar. A principal comparação foi com a taxa de contaminação no grupo determinado como controle. Como o objetivo desse estudo é comparar a eficiência dos métodos de anti-sepsia intrabucal, na redução da contaminação de culturas de micobactérias de pacientes com suspeita clínica ou radiográfica de tuberculose pulmonar, foi estabelecido um intervalo de confiança para diferença de proporções de 95% em todos os testes.

4.14 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico (CEP local), em abril de 2007 (Anexo A). Todos os indivíduos foram esclarecidos quanto ao estudo e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento (Anexo I).

Resultados

5 Resultados

O presente capítulo foi dividido em 7 seções: **1)** caracterização dos indivíduos nos grupos de estudo (CHX ou CPC) em relação às variáveis demográficas, clínicas e aos fatores de risco; **2)** caracterização das variáveis que interferem no exame de cultura por grupo de estudo (CHX e CPC); **3)** análise da taxa de contaminação das culturas de amostras obtidas dos pacientes antes e após intervenção com os anti-sépticos CHX e CPC; **4)** análise comparativa dos grupos de estudo CHX e CPC em relação aos resultados de contaminação das culturas; **5)** análise da taxa de contaminação das culturas a partir de amostras de escarro do grupo controle em meio MGIT nas concentrações de PANTA 1X e PANTA 2X; **6)** análise da taxa de positividade das culturas a partir de amostras de pacientes dos grupos controle e de intervenção; **7)** contribuição do uso de anti-sépticos bucais para o exame de cultura de micobactérias.

5.1 Caracterização dos indivíduos nos grupos de estudo (CHX ou CPC)

No período de dezembro de 2007 a dezembro de 2008, foram avaliados 136 pacientes com suspeita clínica e radiográfica de TB pulmonar. Nesse estudo, 16 pacientes (13,3%) foram excluídos da análise por não terem coletado a segunda amostra de escarro, impossibilitando a análise dos resultados das taxas de contaminação nos meios de cultura.

Dos 120 pacientes selecionados para o estudo, um total de 59 pacientes com suspeita clínica e radiográfica, foi selecionado através de uma tabela de números aleatórios para o grupo CHX, enquanto para o grupo CPC foram selecionados 61 indivíduos com suspeita clínica e radiográfica de TB pulmonar.

As variáveis demográficas, clínicas e os fatores de risco dos pacientes estudados nos diferentes grupos de estudo (CHX ou CPC) estão descritos na **TABELA 1**.

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E DOS FATORES DE RISCO PARA OS GRUPOS DE ESTUDO CHX E CPC

	Grupo Intervenção (CHX) (n = 59)	Grupo de Intervenção (CPC) (n = 61)	χ^2 p valor
Média de idade (anos \pm DP) ^a	30,89 \pm 8,23	32,01 \pm 9,43	0.4901
Sexo			
Masculino	54 (91, 53%)	58 (95, 08%)	0,4357
Feminino	5 (8, 47%)	3 (4, 92%)	
Rx			
Com cavidade	15 (25, 42%)	15 (24, 60%)	0,9174
Sem cavidade	44 (74, 58%)	46 (75, 40%)	
História prévia de TB pulmonar			
Sim	7 (11, 86%)	7 (11, 47%)	0,9469
Não	52 (88, 14%)	54 (88, 53%)	
Tabagista	12 (20, 33%)	15 (24, 59%)	0,5763
Alcoolismo	13 (22, 0%)	8 (13, 11%)	0,1999
HIV			
Negativo	59 (100%)	61(100%)	-

[†] - Foi utilizado o Teste T para amostras independentes (p- valor).

^a – DP (desvio –padrão).

A idade dos pacientes nos diferentes grupos de estudo variou de 20 – 57 anos. No grupo CHX a idade média foi de 30,89 anos, enquanto no grupo CPC a idade média encontrada foi de 32,01 anos. Em relação ao sexo, em ambos os grupos, houve predominância do sexo masculino.

Como parte dos procedimentos de triagem nas Unidades de Saúde, os pacientes incluídos no estudo que tinham suspeita clínica de tuberculose foram submetidos a

um exame radiográfico do tórax. A análise dos exames radiográficos do tórax revelou que a maioria (74,58%) dos pacientes do grupo CHX não apresentava cavidades no exame radiográfico, enquanto 25,42% dos pacientes apresentavam cavidades no exame radiográfico. O mesmo foi observado no grupo CPC, onde a maioria (75,40%) dos pacientes também não apresentava cavidades no exame radiográfico, enquanto uma minoria (24,60%) dos pacientes apresentava cavidades no exame radiográfico do tórax.

História prévia de TB pulmonar foi confirmada, em ambos os grupos de estudo (CHX e CPC), em 11,86% e 11,47% dos pacientes, respectivamente, no período mínimo de um ano. Nos 88,14% (grupo CHX) e 88,53% (grupo CPC) dos pacientes restantes não foram confirmados história prévia de TB pulmonar.

Nesse estudo, a presença de indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi critério de exclusão. Em ambos os grupos CHX e CPC, os pacientes apresentaram resultado negativo para o teste de HIV.

Em relação às variáveis tabagismo e etilismo foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa em ambos os grupos. O tabagismo esteve presente no grupo CHX em 20,33% dos pacientes, enquanto no grupo CPC 24,59% dos pacientes fumavam.

Nenhuma variável se mostrou estatisticamente significativa, o que retifica a homogeneidade entre os grupos CHX e CPC.

Os principais sintomas apresentados pelos pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar para os diferentes grupos de estudo estão descritos na **TABELA 2**. Dentre os principais sintomas, a presença de tosse há mais de 3 semanas esteve presente em 100% dos pacientes. Os outros principais sintomas observados foram febre, sudorese noturna e emagrecimento. Avaliando a presença desses sintomas nos pacientes com e sem tuberculose pulmonar nos diferentes grupos CHX e CPC, não se observou diferença com significância estatística, exceto em relação à variável emagrecimento, nos pacientes que realizaram a intervenção com o anti-séptico CPC ($p= 0,030$).

TABELA 2 – PRINCIPAIS SINTOMAS APRESENTADOS PELOS PACIENTES COM SUSPEITA DE TUBERCULOSE PULMONAR PARA OS GRUPOS CHX E CPC

Sintomas	Grupo de Estudo					
	CHX (n= 59)			CPC (n= 61)		
	TB n= 26 (%)	Não TB n= 33 (%)	<i>P</i>	TB n= 22 (%)	Não TB n= 39 (%)	<i>P</i>
Febre	12 (46, 1%)	15 (45, 4%)	0,939	16 (72, 7%)	25 (64, 1%)	0,307
Sudorese Noturna	19 (73, 0%)	26 (78, 8%)	0,461	16 (72, 7%)	23 (59, 0%)	0,116
Emagrecimento	18 (69, 2%)	18 (54, 5%)	0,100	17 (77, 3%)	23 (59, 0%)	0,030

5.2 Caracterização das variáveis que interferem no exame de cultura por grupos CHX e CPC

Com o objetivo de verificar quais variáveis interferem no exame de cultura, e verificar se esses episódios de contaminação nas culturas de micobactérias estão relacionados a essas variáveis, foram analisadas as seguintes variáveis para os diferentes grupos de estudo: aspecto da amostra, quantidade de escarro, uso de prótese, tabagismo e número de escovações diárias (**TABELA 3**).

TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE INTERFEREM NO EXAME DE CULTURA POR GRUPO DE ESTUDO (CHX E CPC).

	Grupo Intervenção (CHX) (n=59)	Grupo de Intervenção (CPC) (n=61)	χ^2 p valor
Aspecto do escarro			
Saliva (Não adequado)	2 (3, 39%)	1 (1, 64%)	0,5393
Mucopurulento (Adequado)	57 (96, 61%)	60 (98, 36%)	
Volume do escarro			
5 -10 mL	53 (89, 83%)	54 (88, 52%)	0,8175
> de 10mL	6 (10, 17%)	7 (11, 48%)	
Uso de Prótese	7 (11, 86%)	8 (13, 11%)	0,8360
Tabagista	12 (20, 33%)	15 (24, 59%)	0,5763
Escovação Diária			
Não escova os dentes	1 (1, 70%)	0 (0%)	0,3065
1 a 2 vezes/dia	19 (32, 20%)	15 (24, 60%)	0,3557
≥ 3 vezes/dia	39 (66, 10%)	46 (75, 40%)	0,2625

Em relação ao aspecto das amostras coletadas pelos pacientes, observou-se em ambos os grupos CHX e CPC que a maioria das amostras foi classificada como mucopurulenta, de boa qualidade, enquanto uma minoria era saliva. Em ambos os grupos de estudo, as amostras classificadas como saliva, foram baciloscopia negativas. Dentre as 6 amostras de 3 pacientes classificadas como saliva, a contaminação esteve presente somente em 1 cultura inoculada no meio MGIT, nos demais pacientes os resultados das culturas foram negativos.

O volume do escarro coletado durante o procedimento de coleta é considerado uma variável que pode interferir no diagnóstico da doença. Nesse estudo, o valor mínimo aceitável foi de 5,0 ml de escarro. Os resultados apresentados na **TABELA 3** mostram que em ambos os grupos de estudo, a maior parte das amostras coletadas variou entre 5-10 ml de escarro.

Ao analisarmos a taxa de contaminação nesses pacientes que fumavam, foi observado no grupo CHX que dos 12 pacientes que fumavam, 4 pacientes tiveram sua cultura contaminada em pelo menos um dos meios de cultura utilizado. O mesmo foi observado no grupo CPC, que observou que dos 15 pacientes que fumavam 4 pacientes também tiveram sua cultura contaminada em pelo menos um dos meios utilizados.

O uso de prótese foi observado em 11,86% dos pacientes que foram selecionados para o grupo CHX, enquanto no grupo CPC a mesma variável foi observada em 13,11% dos pacientes ($p = 0,8360$).

Ainda em relação à **TABELA 3**, ao analisarmos a variável de higiene bucal descrita (escovação diária) observou-se em ambos os grupos CHX e CPC, que a maior parte dos pacientes realizava no mínimo 3 escovações por dia.

Em ambos os grupos CHX e CPC, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto às variáveis: aspecto do escarro, volume da amostra, uso de prótese, tabagismo e número de escovações diárias.

5.3 Análise da taxa de contaminação das culturas obtidas a partir de amostras dos pacientes antes e após intervenção com os anti-sépticos CHX e CPC

Os dados apresentados nas **TABELAS 4 e 5** mostram os resultados da taxa de contaminação encontrada nas culturas no meio sólido e líquido para amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle em relação ao grupo de intervenção (CPC ou CHX).

Como pode ser observado na **TABELA 4**, para as amostras inoculadas em meio Ogawa, após a intervenção com o anti-séptico CHX houve uma pequena redução na taxa de contaminação, mas não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação às amostras coletadas dos pacientes que realizaram anti-sepsia bucal somente com água (5,08% e 10,16%; respectivamente). Entretanto, para as amostras inoculadas no meio líquido MGIT, após a intervenção com o anti-séptico CHX a taxa de contaminação das culturas reduziu significativamente de 18,63% para 6,77% (OR: 0,125; IC= 0,002 – 0,932; $p= 0,0391$).

Considerando os resultados da taxa de contaminação nas amostras de pacientes que sofreram intervenção com o anti-séptico CPC, foi observada uma redução na taxa de contaminação somente quando o MGIT foi utilizado, apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (**TABELA 5**).

TABELA 4 – AVALIAÇÃO DA TAXA DE CONTAMINAÇÃO DAS CULTURAS NO MEIO SÓLIDO E LÍQUIDO A PARTIR DE AMOSTRAS DE ESCARRO COLETADAS DE PACIENTES DO GRUPO CONTROLE E DO GRUPO DE INTERVENÇÃO PELO CHX

Meio de Cultura	Pacientes n (%)	Controle	Intervenção (CHX) [‡]	OR	IC a 95%	p valor
Ogawa	59	6(10, 16%)	3(5, 08%)	0,25	0,005 – 2,526	0,3750
MGIT (PANTA 1X)	59	11(18, 63%)	4 (6, 77%)	0,125	0,002 – 0,932	0,0391

[‡] – grupo que foi randomizado para a anti-sepsia com clorexidina.

TABELA 5 – AVALIAÇÃO DA TAXA DE CONTAMINAÇÃO DAS CULTURAS NO MEIO SÓLIDO E LÍQUIDO A PARTIR DE AMOSTRAS DE ESCARRO COLETADAS DE PACIENTES DO GRUPO CONTROLE E DO GRUPO DE INTERVENÇÃO PELO CPC

Meio de Cultura	Pacientes n (%)	Controle	Intervenção (CPC) [§]	OR	IC a 95%	p valor
Ogawa	61	5 (8, 19%)	5(8, 19%)	1,0	0,724 – 13,795	1,0
MGIT (PANTA 1X)	61	11 (18, 03%)	9 (14, 75%)	0,66	0,138 – 2,811	0,7539

[§] – grupo que foi randomizado para a anti-sepsia com cloreto de cetilpiridínio.

5.4 Análise comparativa dos grupos CHX e CPC em relação aos resultados de contaminação das culturas inoculadas no meio Ogawa e MGIT

Como pode ser observado no **GRÁFICO 1**, quando considerada a análise por grupo, nas amostras inoculadas no meio Ogawa e submetidas à intervenção com o anti-séptico CHX a taxa de contaminação observada foi menor que a encontrada em relação ao grupo CPC (5,08% e 8,19%, respectivamente). Apesar disso, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos de estudo, quando o meio utilizado foi o Ogawa ($p=0,4946$).

Ao analisarmos a taxa de contaminação entre os grupos CHX e CPC no meio líquido MGIT, embora tenha sido observada uma redução na taxa de contaminação nas culturas das amostras após a intervenção com o anti-séptico CHX em relação ao grupo CPC (6,77% e 14,75%, respectivamente), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo ($p=0,1596$).

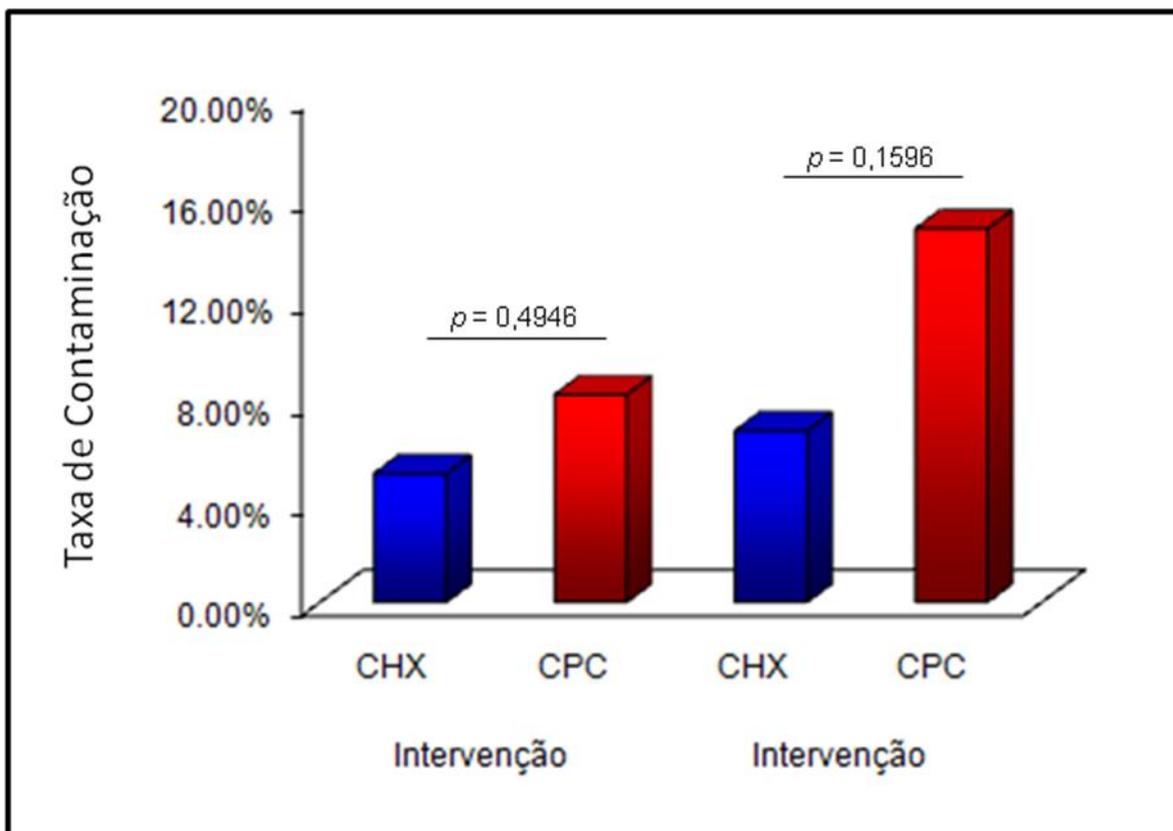


GRÁFICO 1 – Análise comparativa da taxa de contaminação no meio Ogawa e no meio Líquido MGIT para os diferentes grupos de estudo

Objetivando avaliar os possíveis tipos de contaminação encontrada nas culturas de micobactérias, foi realizado um esfregaço das culturas contaminadas utilizando a técnica de coloração de Ziehl – Neelsen e o cultivo em placas de ágar – sangue. Após essa análise, observou-se um total de 28 culturas contaminadas no grupo CHX. Dessas, foi observado um predomínio de bactérias contaminantes nas amostras controles (57,15%). Após o uso do anti-séptico CHX foi verificada uma redução na presença de bactérias contaminantes em relação às amostras controles (17,85%) (**GRÁFICO 2**).

A análise da taxa de fungos encontrada nas culturas de micobactérias mostrou nas amostras controles do grupo CHX, uma contaminação de 17,85%. Com a utilização do anti-séptico essa taxa diminuiu para 7,14%.

Considerando os resultados da presença de organismos contaminantes no grupo CPC, foi observado nas amostras controles 41,18% de contaminação por bactérias

contaminantes. Contudo, após o uso do anti-séptico houve uma diminuição na taxa de contaminação por essas bactérias (17,65%) (**GRÁFICO 2**).

A taxa de fungos encontrada no grupo CPC foi 29,41%. Após o uso do anti-séptico foi verificado uma redução na taxa de contaminação por esses organismos (11,76%).

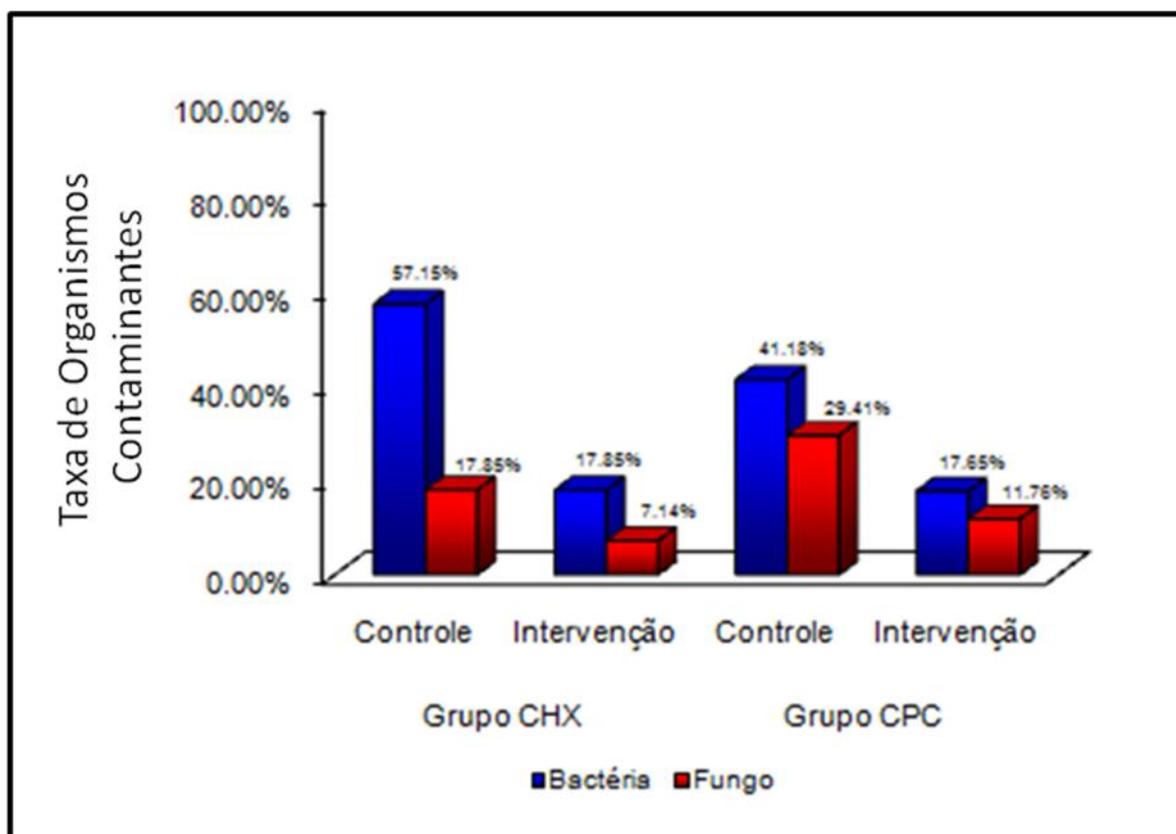


GRÁFICO 2 – Análise comparativa dos organismos contaminantes presente nas amostras dos pacientes nos diferentes grupos de estudo

5.5 Análise da taxa de contaminação das culturas a partir de amostras de escarro do grupo controle em meio MGIT nas concentrações de PANTA 1X e PANTA 2X

A **TABELA 6** mostra a taxa de contaminação das culturas inoculadas no meio MGIT para amostras de escarro coletadas dos 120 pacientes após a higienização com água (grupo controle). Os resultados obtidos nessa análise mostraram que o uso de uma concentração maior de antimicrobiano (PANTA 2X) reduziu a taxa de contaminação de 22 culturas para 8, quando comparado com o uso de PANTA 1X ($p= 0, 0059$).

TABELA 6 – AVALIAÇÃO DA TAXA DE CONTAMINAÇÃO DAS CULTURAS NO MEIO LÍQUIDO MGIT A PARTIR DE AMOSTRAS DE ESCARRO COLETADAS DE PACIENTES APÓS A HIGIENIZAÇÃO COM ÁGUA (GRUPO CONTROLE)

Grupo de Estudo	MGIT (PANTA 1X) n (%)	MGIT (PANTA 2X) n (%)	p valor
Controle (n=120)	22 (18, 33%)	8 (6, 6%)	0, 0059

5.6 Análise da taxa de positividade das culturas a partir de amostras de pacientes dos grupos controle e de intervenção

Os resultados obtidos da análise da taxa de positividade das culturas no meio Ogawa e no MGIT para amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle estão descritas na **TABELA 7**.

De um total de 120 pacientes selecionados com suspeita clínica ou radiográfica para tuberculose pulmonar, 47 (39,16%) pacientes tiveram suas culturas identificadas como *M. tuberculosis* em alguma das coletas de escarro realizadas. A taxa de positividade encontrada nas amostras controles inoculadas no meio Ogawa foi de 23,33%; com um tempo médio para detecção do bacilo de 22 dias.

Nas amostras inoculadas no MGIT (PANTA1X) essa taxa de positividade foi relativamente maior (29,16%), com um tempo médio de detecção menor que o encontrado nas amostras inoculadas no meio Ogawa (aproximadamente 9 dias). Ao submeter às amostras controles a concentrações maiores de PANTA (PANTA - 2X) foi observada uma taxa de positividade das culturas de 31,66%, com um tempo médio de detecção do bacilo em torno de 10 dias.

TABELA 7 – AVALIAÇÃO DA TAXA DE POSITIVIDADE DAS CULTURAS NO MEIO OGAWA E MGIT PARA AMOSTRAS DE ESCARRO COLETADAS DE PACIENTES DO GRUPO CONTROLE

Dia de Estudo	Ogawa n (%)	DTP [†]	MGIT (PANTA 1X) n (%)	DTP	MGIT (PANTA 2X) n (%)	DTP
Controle (n= 120)	28 (23,33%)	22,3	35 (29, 16%)	8,87	38 (31, 66%)	9,91

[†] - DTP: dia de positividade.

Das 38 culturas positivas no MGIT (PANTA 2X), em 31 pacientes a cultura foi positiva em ambas as concentrações de PANTA (1X e 2X). Em 7 pacientes a cultura estava contaminada no meio MGIT (PANTA 1X). Desses, em 2 dos pacientes a cultura apresentou crescimento de outra bactéria contaminante além de BAAR no meio MGIT com PANTA 1X. Em 4 pacientes as culturas foram positivas somente no MGIT (PANTA 1X).

5.7 Contribuição do uso de anti-sépticos bucais para o exame de cultura de micobactérias

Das 40 culturas positivas no MGIT após a utilização do anti-séptico (21 culturas positivas no CHX e 19 culturas positivas no CPC) houve um acréscimo na detecção de cultura positiva em 14 dos pacientes em relação ao grupo controle para as culturas das amostras inoculadas em meio MGIT (PANTA 1X). Dessas, em 7 dos pacientes a cultura da amostra controle estava contaminada, e nos 7 pacientes restantes a cultura da amostra controle era negativa (**TABELA 8**).

Quando o meio Ogawa foi utilizado houve um acréscimo na detecção de cultura positiva, após o uso de anti-sépticos, em 5 dos pacientes. Desses, em 2 dos pacientes a cultura era negativa na cultura da amostra controle e, em 3 dos pacientes a cultura estava contaminada na cultura da amostra controle.

TABELA 8 – AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DO USO DE ANTI-SÉPTICOS BUCAIS PARA O EXAME DE CULTURA DE MICOBACTÉRIAS EM MEIO MGIT

Cultura (Grupo Controle)	Cultura no MGIT (Grupo de Intervenção)			
	Positiva	Negativa	Contaminada	Total
MGIT (PANTA 1X)				
Positiva	28	4	3	35
Negativa	5	56	2	63
Contaminada	7	7	8	22
Total	40	67	13	120

Discussão

6 Discussão

O diagnóstico precoce da tuberculose é fundamental para o controle da doença, uma vez que possibilita a implantação de medidas profiláticas e instituição de terapia adequada, reduzindo assim a capacidade do paciente em transmitir a doença (PALOMINO, 2005; DROBNIEWSKI *et al*, 2003). Apesar das técnicas de biologia molecular apresentarem uma excelente sensibilidade em amostras de pacientes bacilíferos, pouco tem contribuído para o diagnóstico de pacientes paucibacilíferos (BRASIL, 2004). Além disso, nenhum desses métodos se mostrou, até agora, mais sensível, principalmente em amostras de pacientes paucibacilares, do que a cultura para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. A cultura em meio sólido ou líquido é, portanto, considerada padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose, pois permite o isolamento e a identificação do agente etiológico (PALOMINO-LEÃO-RITACCO, 2007).

No entanto, apesar das contribuições da cultura para o diagnóstico da tuberculose, a mesma apresenta limitações. A contaminação da cultura por outros organismos contaminantes impede o diagnóstico e aumenta o risco de transmissão da doença. Diante deste problema, muitos laboratórios de países em desenvolvimento utilizam uma concentração final do hidróxido de sódio que varia entre 1,25% - 1,5% para o processamento do espécime (KENT & KUBICA, 1985). A exemplo destes locais, o Laboratório de Micobacteriologia do NDI-UFES adotou a partir de 2001 o procedimento de descontaminação das amostras com NaOH a uma concentração de 1,25% em razão de elevadas taxas de contaminação observadas em suas culturas (15% no meio líquido a 18% no meio sólido). Vale ressaltar que o laboratório é referência na realização de ensaios clínicos diagnósticos e terapêuticos em TB os quais apresentam como critério básico de inclusão ou de permanência, pacientes com resultados de culturas (positivos e ou negativos) desprovidos de contaminação.

Em 2005 o Laboratório de Micobacteriologia do NDI-UFES iniciou um estudo para avaliar o índice de contaminação de culturas a partir de amostras de escarro coletadas de pacientes sob orientação e condições controladas utilizando duas concentrações diferentes de NaOH: a recomendada pelo Manual do Ministério da Saúde, que utiliza NaOH a 1%, e a utilizada em nosso laboratório (NaOH a 1,25%). Verificou-se que para as amostras submetidas a uma concentração de NaOH a 1% a

taxa de contaminação nas culturas foi de 14%, enquanto para as amostras submetidas a uma concentração maior de NaOH (1,25%) o índice de contaminação nas culturas foi de 10% ($p= 0,001$). Apesar da diminuição na taxa e contaminação das culturas, foi observado que nas amostras submetidas a uma concentração mais elevada de NaOH a taxa de detecção de micobactérias foi menor do que o observado nas amostras submetidas a uma concentração de NaOH a 1% (PERES et al., 2008 – submetido a publicação no International Journal of Tuberculosis and Lung Disease).

Estes resultados causaram um impacto direto em nosso estudo, pois neste momento um total de 96 pacientes já havia sido arrolado e suas amostras de escarro processadas a uma concentração de NaOH a 1,25%. Diante desta situação optamos por reiniciar o estudo utilizando uma concentração de NaOH a 1% para o processamento das amostras e excluir dessa análise os 96 pacientes já arrolados. Os resultados dos grupos CHX e CPC que utilizaram a concentração de NALC-NaOH a 1,25% foram avaliados separadamente e encontram-se no **ANEXO III**.

A análise comparativa dos grupos de estudo CHX e CPC em relação à contaminação das culturas se restringiu, portanto a concentração de NALC – NaOH a 1,0%, sendo representada por 59 pacientes no grupo CHX e 61 pacientes no grupo CPC.

6.1 Caracterização da população estudada nos grupos de estudo

Nesse contexto, iniciamos o estudo analisando a população estudada nos grupos CHX e CPC. Nossa primeira observação em ambos os grupos, foi o predomínio do sexo masculino. Essa predominância é concordante com a maioria dos relatos de literatura. Uma das possíveis explicações para essa diferença é que homens têm maior atividade social e ocupacional, principalmente nos países com baixas condições socioeconômicas (GUZMAN et al., 1999; KHAN et al., 2007). Além disso, fatores de ordem biológica, estilo de vida, cuidado com a saúde, também parecem ser responsáveis por esta relação. Outra hipótese sugere que as mulheres apresentam maior dificuldade para expectorar e fornecer o escarro para realização de exames de baciloscopia, e, portanto, poderia estar acontecendo uma sub-

detecção de casos (HOLMES et al, 1998). Khan e colaboradores (2007) mostraram que uma menor positividade da baciloscopia em mulheres, quando comparada à encontrada nos homens, esta relacionada à qualidade da coleta do espécime. No presente estudo essa comparação não foi realizada devido ao pequeno número de pacientes do sexo feminino. Estudos futuros devem ser realizados incluindo um maior número de pacientes do sexo feminino, para se reforçar se o sexo está relacionado à qualidade da coleta da amostra e consequentemente a maiores taxas de contaminação nas culturas desses pacientes.

A tuberculose pode acometer as várias faixas etárias da população, embora crianças e idosos apresentem um maior risco de desenvolver a doença. Nossos resultados mostram que a média de idade observada no grupo CHX foi de 32 anos semelhante ao observado no grupo CPC, de 33 anos. Essa predominância de adultos jovens deve-se ao critério de inclusão estabelecido no estudo, acima de 18 anos. Embora o valor encontrado seja compatível com outros estudos que evidenciam que, em países em desenvolvimento como o Brasil, a tuberculose acomete principalmente a população economicamente ativa, conferindo uma conotação social à doença (TOMAN, 1980; SEVERO et al, 2007).

Os sintomas apresentados estão presentes na maioria dos pacientes, embora sejam inespecíficos e tenham ocorrido tanto nos pacientes com a doença quanto naqueles sem a doença. Nossos dados corroboram com os existentes na literatura que demonstram que a frequência com o qual a febre tem sido observada nos pacientes com tuberculose pode variar de 37% a 80% (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). Em relação à variável emagrecimento, provavelmente a relativa demora diagnóstica expõe o paciente a maior tempo de doença sem intervenção terapêutica, e consequentemente ao emagrecimento.

As principais co-morbidades em ambos os grupos CHX e CPC foram o alcoolismo e o tabagismo, e estes dados estão de acordo com outros estudos, que demonstraram forte associação entre a tuberculose e o alcoolismo, o que é compreensível, pois o alcoolismo predispõe o indivíduo a um quadro clínico de baixa imunidade além de estar relacionado com a ingestão irregular dos medicamentos ou até mesmo com o abandono do tratamento (BURMAN et al, 1997). Além disso, a presença de uma flora oral diferenciada pode ser observada em alguns pacientes em condições de

imunossupressão, ou que são portadores de doenças como diabetes mellitus e o alcoolismo (SHARP et al. , 2004).

O tabagismo representa outra co-morbidade que tem sido relacionada ao risco de adoecimento por tuberculose (ALCAIDE et al, 1996; KOLLAPPAN e GOPI, 2002) mas não foi observada associação identificando esse hábito com uma pior qualidade da amostra coletada e uma maior taxa de contaminação nas culturas dos pacientes SRs.

A infecção pelo HIV é considerada o maior fator de risco para o desenvolvimento da tuberculose. Entretanto, essa característica era critério de exclusão nesse estudo. Diante desse contexto, estudos futuros devem ser realizados na tentativa de verificar se a infecção pelo HIV é um fator determinante para uma maior taxa de contaminação nas culturas de pacientes sintomáticos respiratórios.

6.2 Análise comparativa dos grupos CHX e CPC em relação às variáveis que interferem no exame bacteriológico

Em relação as variáveis que podem estar relacionadas a maiores taxas de contaminação nas culturas de micobactérias, vale ressaltar que alguns estudos alertam para o fato de que a contaminação observada nas culturas de micobactérias pode ser reflexo das condições de coleta, qualidade e transporte dos espécimes clínicos, e o tempo até sua inoculação no meio de cultura (RAO et al, 1966; HANNA et al, 1997). Nos quatro estudos realizados por Rao e colaboradores (1966) as condições de armazenamento e transporte do espécime clínico foram os principais fatores associados a uma maior contaminação na cultura do paciente.

Nesse contexto, Maciel e colaboradores, em 2008, alertaram para o fato de que a coleta de escarro de forma padronizada, ou seja, orientada e a higienização bucal antes da coleta do espécime, reduz em até 3 vezes a taxa de contaminação nas culturas de micobactérias. Objetivando esse resultado, e de acordo com as recomendações do Manual do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), todos os pacientes foram orientados pelos pesquisadores antes da realização da coleta do escarro. Diante dessa orientação, em ambos os grupos CHX e CPC, foi observado

uma quantidade pequena de pacientes que tiveram suas amostras classificadas como saliva (2 pacientes no grupo CHX e 1 paciente no grupo CPC). Essa variável não apresentou diferença estatisticamente significativa. Ainda em relação a uma coleta padronizada, em 1966, Rao e colaboradores, observaram que a orientação antes e durante a coleta do espécime clínico auxilia na redução da taxa de contaminação das culturas de micobactérias e melhora a detecção dos casos da doença.

Outra consideração importante que pode influenciar na taxa de positividade e contaminação nas culturas dos pacientes SRs é o intervalo entre a coleta e a inoculação no meio de cultura (RAO et al., 1966). Essa variável foi controlada, uma vez que todas as amostras após a coleta do espécime foram transportadas em recipientes refrigerados e processadas imediatamente ao chegarem ao laboratório, sendo inoculadas nos devidos meios de culturas com adição de antibióticos após sua descontaminação.

Um dos aspectos ainda avaliados nesse estudo foi o uso de prótese uma vez que Sharp e colaboradores relataram que a utilização de próteses ou dentaduras aumenta a chance de ter uma microbiota mais rica em microrganismos contaminantes. Com relação a essa característica, os resultados obtidos, em ambos os grupos CHX e CPC, mostraram que essa variável não está associada a maiores taxas de contaminação. Nos pacientes analisados que utilizavam prótese, em nenhum deles verificou-se cultura contaminada.

Em relação às condições de saúde bucal e ao número de escovações diárias da população estudada, nenhuma associação pode ser observada. A maioria dos pacientes analisados relatou realizar pelo menos duas escovações diárias. Entretanto, há evidências que uma maior higienização bucal antes da coleta do escarro reduz a população de organismos contaminantes na microbiota oral (MONROE et al., 1969; MANUAL DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

6.3 Análise da taxa de contaminação das culturas de amostras obtidas dos pacientes antes e após intervenção com os anti-sépticos CHX e CPC

Tendo em vista a redução da taxa de contaminação nas culturas de micobactérias e baseado em outros estudos, optamos pelo emprego de anti-sépticos bucais antes da coleta do escarro. Em 1998, Barros e colaboradores, mostraram que o uso de anti-sépticos bucais utilizado em bochechos, reduz a população de bactérias aeróbias e anaeróbias da cavidade oral, especialmente os estreptococos. Analisando os resultados obtidos nesse estudo, observou-se que após o uso do anti-séptico CHX, foi verificada uma redução estatisticamente significativa no índice de contaminação das culturas de micobactérias em relação ao pacientes do grupo controle. Esses resultados foram, sobretudo, observados nas amostras inoculadas no meio líquido MGIT ($p=0,0391$). Assim podemos sugerir que o uso de clorexidina antes de coletar o escarro como complemento a higienização bucal auxilia na redução de organismos contaminantes da microbiota oral. Ao analisarmos os resultados das amostras dos pacientes que utilizaram o CPC como anti-séptico bucal, apesar ter sido observado uma redução na taxa de contaminação das culturas de micobactérias inoculadas no meio líquido MGIT, esse anti-séptico não se mostrou mais eficaz que a clorexidina.

Segundo McDonnell & Russell (1999), a clorexidina atua principalmente sobre bactérias gram positivas e fungos do gênero *Cândida*, sendo geralmente resistentes a micobactérias.

Ainda em relação as elevadas taxas de contaminação encontradas nas culturas de micobactérias em meio MGIT, os resultados obtidos mostraram-se muito maiores do que os encontrados em estudos realizados por outros pesquisadores (HANNA et al., 1999; TORTOLI et al., 1999; ALCAIDE et al., 2000; KANCHANA et al., 2000; LEITRITZ et al., 2001; SOMOSKOVI et al., 2000). Entretanto, essas taxas de contaminação encontradas foram menores que as reportadas por Cornfield e colaboradores em 1997 (29,8% de contaminação) e White e colaboradores em 2000 (30% de contaminação no MGIT).

Segundo Scarparo e colaboradores (2002) uma das desvantagens dos meios líquidos é o crescimento de outros organismos como bactérias e fungos no meio de

cultura. Um fato interessante foi descrito por Cornfield e colaboradores (1997) e Hanna e colaboradores (1999), que relataram que uma elevada taxa de contaminação encontrada nas amostras inoculadas no MGIT deve-se provavelmente ao fato que esse sistema utiliza um meio mais enriquecido para o crescimento mais rápido das micobactérias. A presença de dextrose no meio MGIT e que não está presente em outros meios líquidos como no meio BACTEC 12B contribuem para o crescimento de microrganismos não micobacterianos no sistema MGIT.

De acordo com White e colaboradores (2000), espécimes provenientes do trato respiratório apresentam taxa de contaminação mais elevadas do que aqueles de outros sítios não estéreis. Cornfield e colaboradores, em 1997 reportaram a presença de *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* coagulase - negativa e *Cornebacterium* spp sendo grande parte de origem respiratória. Entretanto, de acordo com esses pesquisadores, a presença de *Pseudomonas* não deveria ser esperada uma vez que o antimicrobiano PANTA exerce atividade contra esse microrganismo. Em 2001, Piersimoni e colaboradores, relataram um maior número de bactérias gram-positivas e *Pseudomonas* spp em culturas no meio líquido

Os resultados obtidos na nossa pesquisa, não permitiram estabelecer um possível perfil das bactérias e fungos contaminantes observadas nos meios de cultura Ogawa e MGIT. No entanto, foi possível verificar a presença de bactérias contaminantes e fungos em maior proporção nas culturas dos pacientes que realizaram a higienização bucal com água (grupo controle) em ambos os grupos.

6.4 Análise da taxa de contaminação das culturas a partir das amostras do grupo controle em meio MGIT nas concentrações de PANTA 1X e PANTA 2 X

Paralelamente, avaliamos o uso de uma concentração maior de PANTA (2X) na redução da taxa de contaminação de culturas de micobactérias inoculadas no meio MGIT. Apesar de evidências mostrarem o uso de antibióticos utilizados nos meios de cultura para inibir o crescimento de microrganismos contaminantes, as taxas de contaminação nesses meios de cultura líquido ainda são elevadas. O sistema MGIT

utiliza a combinação de PANTA na concentração de 1X para minimizar a presença desses organismos no meio de cultura.

Nossos resultados mostraram de maneira inédita que, o uso de uma concentração maior do antimicrobiano PANTA (PANTA 2x) nas amostras controles dos pacientes, reduziu significativamente a população de organismos contaminantes, principalmente bactérias contaminantes, sem reduzir a taxa de detecção do *M. tuberculosis*. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados por Chang e colaboradores (2002) que verificaram que após o uso modificado dos antibióticos utilizados no PANTA, como vancomicina, anfotericina B e ácido nalidixico (VAN), no meio MGIT, a taxa de contaminação nesse meio diminuiu sem mostrar nenhuma alteração no tempo e na taxa de detecção para culturas do *M. tuberculosis*.

Entretanto, não foi objetivo desse estudo avaliar também o uso de PANTA 2X nas amostras após a intervenção com os anti-sépticos. Tendo em vista que esse procedimento sozinho era uma alternativa viável na redução da taxa de contaminação das culturas de micobactérias

6.5 Contribuição do uso de anti-sépticos bucais para o exame de cultura de micobactérias

Para investigar se o uso de uma concentração maior de PANTA (PANTA 2X) ou se resíduos dos anti-sépticos poderiam resultar numa diminuição na taxa de detecção das culturas de micobactérias avaliamos a taxa de positividade nessas culturas.

Os resultados obtidos dessa análise revelaram uma taxa de positividade superior aos relatados em outros estudos (TORTOLI et al, 1999; HANNA et al, 1999; SCARPARO et al, 2002). Esses resultados foram semelhantes ao reportado por Chien e colaboradores em 2000, que detectaram micobactéria em 34% das culturas. Este maior número de pacientes diagnosticados em nosso estudo poderia ser decorrente da realização de duas Campanhas de Combate a Tuberculose promovidas pelos Programas de Controle a Tuberculose e pelas Prefeituras locais. Avaliando os resultados de positividade no meio Ogawa e MGIT (23,33% e 29,16%, respectivamente) observamos que esses dados foram similares com os resultados

encontrados por outros autores que mostram uma maior positividade no meio líquido em relação ao meio sólido (TORTOLI et al, 1999; SCARPARO et al, 2002; LEE et al, 2003).

Em relação ao tempo médio de detecção da positividade no meio sólido observou-se que foi de 22 dias, enquanto no meio MGIT o tempo médio de detecção foi menor (9 dias para o MGIT PANTA 1X e 10 dias no MGIT PANTA 2X). Nesse contexto, esses resultados obtiveram uma média semelhante no tempo de detecção em relação aos trabalhos publicados (PFYFFER et al, 1997; TORTOLI et al, 1999; SCARPARO et al, 2002; LEE et al, 2003).

Além disso, os resultados obtidos em nosso estudo reforçam a hipótese de que a introdução de meio líquido para detecção de micobactérias aumenta a sensibilidade de isolamento do bacilo e diminui o tempo de detecção. Segundo Somoskovi & Magyar (1999) o tempo médio de detecção do *M. tuberculosis* no meio líquido é inferior ao observado nos meios sólidos.

É importante ressaltar que houve um incremento importante na detecção da cultura em 14 dos pacientes após o uso dos anti-sépticos bucais comparado com o grupo controle quando o meio utilizado foi o MGIT (PANTA 1X). Isto nos sugere que o uso do anti-séptico como complemento para higienização bucal contribuiu na redução da taxa de contaminação das culturas desses pacientes, auxiliando dessa forma na detecção da doença.

Apesar disso, para validar esses resultados considera-se necessário aumentarmos o número amostral de pacientes, visto que o número analisado nesse estudo foi relativamente pequeno.

Com base nos resultados obtidos podemos inferir que uma melhor higienização oral antes de realizar a coleta do escarro com uso do anti-séptico clorexidina reduz a presença de organismos contaminantes, como bactérias ou fungos, na microbiota oral e diminui a taxa de contaminação de cultura, sobretudo em meio de cultura líquido (MGIT).

Além disso, a introdução de uma concentração maior do antimicrobiano PANTA (2X) no meio de cultura MGIT auxilia na redução da contaminação por outros

microrganismos contaminantes no meio de cultura. Essas estratégias podem melhorar o índice de contaminação observado nas culturas de micobactérias, dessa forma auxiliar no diagnóstico precoce da tuberculose.

Conclusões

7 Conclusões

1. O digluconato de clorexidina como complemento a higienização bucal contribuiu significativamente na redução da taxa de contaminação das culturas de micobactérias, auxiliando dessa forma na detecção de casos da doença.
2. O digluconato de clorexidina mostrou-se mais eficiente na redução da taxa de contaminação de organismos contaminantes, como fungos e outras bactérias, do que o cloreto de cetilpiridínio, sobretudo nas culturas em meio líquido (MGIT).
3. Os resultados desse estudo mostraram um predomínio de bactérias contaminantes nas culturas do grupo controle, em ambos os grupos CHX e CPC, em relação a taxa de contaminação por fungos.
4. A utilização de PANTA 2X no meio de cultura MGIT mostrou-se mais eficiente na redução da taxa de contaminação nas culturas de micobactérias quando comparado com o PANTA 1X, sem reduzir a taxa de detecção dessas culturas.
5. Os resultados desse estudo não mostraram associação quanto à taxa de contaminação para as variáveis uso de prótese e tabagismo.

Perspectivas

8 Perspectivas

1. Ampliar o número de pacientes com suspeita clínica ou radiográfica de tuberculose pulmonar, com o intuito de validar o uso do anti-séptico bucal (clorexidina) como complemento a higienização oral antes da coleta do espécime;
2. Verificar se a taxa de contaminação em culturas de escarro de pacientes HIV positivos é mais elevada do que em culturas de pacientes HIV negativos;
3. Avaliar o custo efetividade do uso de anti-sépticos bucais na rotina laboratorial como complemento ao exame de cultura.

Referências Bibliográficas

9 Referências Bibliográficas

AGY MB, WALLIS CK, FLORDE JJ, CARLSON LC, COYLE MB. **Evaluation of four mycobacterial blood culture media: BACTEC 13A, Isolator/BACTEC 12B, Isolator/Middlebrook Agar and a biphasic medium.** *Diagn Infect Dis* 1989; 12 (4):303-8.

ALCAIDE J, ALTET MN, PLANS P, PARRON I, FOLGUERA L, SALTO E, DOMINGUEZ A, PARDELL H, SALLERAS L. **Cigarette smoking as a risk factor for tuberculosis in Young adults: a case-control study.** *Tuber Lung Dis* 1996; 77(2): 112-16.

AMERICAN THORACIC SOCIETY: **Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children.** *Am J Respir Crit Care Med*, v. 161, n. 4. p, 1376 – 1395, 2000.

ARANAZ A, LIÉBANA E, GÓMEZ-MAMPASO E, GALÁN JC, COUSINS D, ORTEGA A, BLÁZQUEZ J, BAQUERO F, MATEOS A, SÚAREZ G, DOMÍNGUEZ L. ***Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolated from goats in Spain.** *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49(Pt 3): 1263–73.

ARANTES GR, RUFFINO-NETTO A. **Case-finding in pulmonary tuberculosis. Photofluorography respiratory symptoms, followed by bacteriological examinations in suspected cases.** *Rev Saude Publica.* 1980; 14(2):185-93.

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 Microbiol.* 2001; 39(12): 4440-44.

BACTEC TB SYSTEM, **Product and Procedure Manual**, MA-0029 Rev. E. Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD. May 1996.

BARROS VMR, ITO IY, AZEVEDO RVP, MORELLO D, ROSATELLI PA. **Estudo comparativo da eficiência de três métodos de anti-sepsia intrabucal na**

redução do número de estreptococos do sulco gengival. Rev Odontol Univ São Paulo, São Paulo July/Sept. 1998; 12 (3): 201-6.

BASS JB, FARER LS, HOPEWELL PC, JACOBS RF, SNIDER DE JR. **Diagnostic standards and classification of tuberculosis.** Am Rev Respir Dis. 1990; 142(3):725-35.

BEHR MA, WARREN SA, SALAMON H, HOPEWELL PC, PONCE de LEON A, DALEY CL, SMALL PM. **Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli.** Lancet 1999; 353(9151): 444-449.

BETHLEM N, BETHLEM EP, RIBEIRO SN, GERHARDT FILHO G, LAPA E SILVA JR, MUZY DE SOUZA GR, CÔRREA JC, MAGARÃO SL, GONTIJO FILHO PP, FONSECA LS, SANT'ANNA CC, HIJAR MA. **Tuberculose.** In: Newton Bethlem, editor. Pneumologia. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 1995. p 379-448.

BLOOM BR, MURRAY CJL. **Tuberculosis: commentary on a reemergent killer.** Science. 1992; 257 (5073): 1055-64.

BOBADILLA-DEL-VALLE M, PONCE-DE-LEON A, KATO-MAEDA M, HERNANDEZ - CRUZ A, CALVA-MERCADO JJ, CHAVEZ-MAZARI B, CABALLERO-RIVERA BA, NOLASCO-GARCIA JC, SIFUENTES-OSORNIO J. **Comparison of sodium carbonate, cetyl-pyridinium chloride, and sodium borate for preservation of sputa for culture of *Mycobacterium tuberculosis*.** J Clin Microbiol. 2003; 41(9): 4487– 88.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. **II Consenso brasileiro de tuberculose – 2004.** J Bras Pneumol. 2004; 30 (Supl. 1).

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço,** 5ª Ed, Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de

Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 2ª edição, Rio de Janeiro, 1994.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Guia de Vigilância Epidemiológica da Tuberculose**, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de atenção básica. **Manual Técnico de Controle da TB: Cadernos de atenção básica**. 6. Ed. Brasília, 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias**. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Espírito Santo**. Brasília, 2007.

BRODIE D, SCHLUGER NW. **The diagnosis of tuberculosis**. Clin Chest Med. 2005; 26(2):247-71.

BUIJTELS PC, PETIT PL. **Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens**. J Microbiol Methods. 2005; 62(1): 83-88.

BURMAN WJ, COHN DL, RIETMEIJER CA, JUDSON FN, SBARBARO JA, REVES RR. **Noncompliance with directly observed therapy for tuberculosis, epidemiology and effect on the outcome of treatment**. Chest 1997; 111: 1168-73.

COSTA-PASSOS AD, FLORES-CARDOSO JC, RUFFINO-NETTO A. **[Association of abreuographic findings of cardiomegaly and clinical manifestations]** Rev Saude Publica. 1987; 21(1):29-36.

CANETTI G. **Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis**. Am Rev Respir Dis. 1965; 92(5): 687-703

CHAN ED, HEIFETS L, ISEMAN MD. **Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review**. Tuber Lung Dis. 2000; 80(3):131 – 140.

CHANG CL, PARK TS, OH SH, KIM HH, LEE EY, SON HC, KIM CM. **Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes with a modified antimicrobial combination.** J Clin Microbiol. 2002;40(10):3845-7.

CHIEN HP, YU MC, WU MH, LIN TP, LUH KT. **Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens.** Int J Tuberc Lung Dis. 2000; 4(9):866-70.

CONVILLE PS, KEISER JF, WITEBSKY FG. **Comparison of three techniques for concentrating positive BACTEC 13A bottles for mycobacterial DNA probes analysis.** Diag Microbiol Infec Dis 1989; 12: 309-13.

CORNFIELD DB, BEAVIS KG, GREENE JA, BOJAK M, BONDI J. **Mycobacterial growth and bacterial contamination in the mycobacteria growth indicator tube and BACTEC 460 culture systems.** J Clin Microbiol. 1997; 35(8):2068-71.

COUSINS DV, BASTIDA R, CATALDI A, QUSE V, REDROBE S, DOW S, DUIGNAN P, MURRAY A, DUPONT C, AHMED N, COLLINS DM, BUTLER WR, DAWSON D, RODRÍGUEZ D, LOUREIRO J, ROMANO MI, ALITO AM, ZUMARRAGA M, BERNADELLI A. **Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov.** Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53(Pt 5):1305 – 14.

CRUCIANI M, SCARPARO C, MALENA M, BOSCO O, SERPELLONI G, MENGOLI C. **Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria.** J Clin Microbiol. 2004; 42 (5): 2321 – 25.

DAMATTO JJ, COLLINS MT, ROTHALAUFG MV, McCLATCHY JK. **Deteccion of mycobacteria by radiometric and standard plate procedures.** J. Clin Microbiol. 1983; 17(6): 1066-73.

DENTON GW. **Chlorhexidine - Disinfection, sterilization and preservation.** In S. S. Block (ed.), 4th ed. Lea and Febiger, Philadelphia, Pa.1991, p. 274–289.

DIETZE R, TEIXEIRA L, ROCHA LM, PALACI M, JOHNSON JL, WELLS C, ROSE L, EISENACH K, ELLNER JJ. **Safety and bactericidal activity of rifalazil in patients**

with pulmonary tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(7):1972-1976.

DROBNIIEWSKI FA, CAWS M, GIBSON A, YOUNG D. **Modern laboratory diagnosis of tuberculosis.** Lancet Infect Dis. 2003; 3(3):141-47.

DUNLAP NE, BASS J, FUJIWARA P, HOPEWELL P, HORSBURGH CR, SALFANGI M. **Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children.** Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161(4):1376 – 95.

ELLNER PD, KIEHN TE, CAMMARATA R, HOSMER M. **Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods.** J Clin Microbiol 1988; 26(7): 1349-52.

FIÚZA DE MELO FA, AFIUNE JB. **Transmissão e imunopatogenia da tuberculose.** J Pneumol, v. 19, p. 19-24, 1993.

FLORES-CARDOSO; COSTA-PASSOS E RUFFINO-NETTO. **Association of abreugraphic findings of the respiratory tract and clinical manifestations.** Rev Saude Publica. 1989 Oct;23(5):368-73.

GARAY SM. **Pulmonary tuberculosis.** In Rom, W.N.; Garay, S. (Ed). Tuberculosis. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 345 – 394.

GEBRE N, KARLSSON U, JONSSON G, MACADEDN R, WOLDE A, ASSEFA A, MIORNER H. **Improved microscopical diagnosis of pulmonary tuberculosis developing countries.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995; 89(2):191-3.

GOESSENS WHF, MAN P, KOELEMAN JGM, LUIJENDIJK A, TE WITT R, ENDTZ HP, VAN BELKUM A. **Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTecET assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens.** J Clin Microbiol. 2005; 43(6): 2563 – 66.

GREENBAUM M, BEYT BE JR, MURRAY PR. **The accuracy of diagnosing pulmonary tuberculosis at a teaching hospital.** Am Rev Respir Dis. 1980;121(3):477-81.

GROSSMAN E, REITER G, STYZENBERG OP. **Six-month study of effects of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults.** J Periodontal Res. 1986; 343(Suppl): 33-43.

GUZMAN CP, VARGAS MH, CRUZ AT, VELARDE- VILARREAL H. **Does Aging modify pulmonary tuberculosis?** Chest. 1999; 116(4): 961-7.

HANNA BA, EBRAHIMZADEH A, ELLIOTT BL, MORGAN MA, NOVAK SM, RUSCHGERDES S, ACIO M, DUNBAR DF, HOLMES MT, REXER CH, SAVTHYAKUMAR C, VANNIER AM. **Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria.** J Clin Microbiol. 1999; 37(3): 748-52.

HANNA BA. **Laboratory diagnosis.** In Rom, W.N.; Garay, S.M. (Ed). **Tuberculosis.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 163 – 181, 2004.

HAVLIR, D. V.; BARNES, P. F. **Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection.** N Engl J Med, 1999v. 340, n. 5, p. 367-373,.

HERSHKOVITZ I, DONOGHUE HD, MINNIKIN DE, BESRA GS, LEE OY, GERNAEY AM, GALILI E, ESHED V, GREENBLATT CL, LEMMA E, BAR-GAL GK, SPIGELMAN M. **Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean.** PLoS ONE. 2008; 3(10):e3426.

HOBBY GL, HOLMAN AP, ISEMAN MD, JONES JM. **Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis.** Antimicrob Agents Chemother. 1973; 4(2): 94-104.

HOLMES CB, HAUSLER H, NUNN P. **A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis.** Int J Tuberc Lung Dis. 1998;2(2):96-104.

HUEBNER RE, GOOD RC, TOKARS JI. **Current practice in mycobacteriology.** J. Clin Microbiol. 1993; 31(4): 771-5.

ICHIYAMA S, SHIMOKATA K, TAKEUCHI J. **Comparative study of a biphasic culture system (Roche MB check system) with a conventional egg medium for recovery of mycobacteria.** Tuberc Lung Dis. 1993; 74(5): 338-41.

KANCHANA MV, CHEKE D, NATYSHAK I, CONNOR B, WARNER A, MARTIN I. **Evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for the recovery of mycobacteria.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000; 37(1):31-36.

KAUFMANN SH. **How can immunology contribute to the control of tuberculosis?** *Nature Rev Immunol.* 2001; 1(1): 20 – 30.

KAUFMANN SH. **New issues in tuberculosis.** *Ann Rheum. Dis.* 2004; 63(Suppl 2):ii50-ii56.

KENT PT, KUBICA GP. **Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory.** 1985. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, U.S. Atlanta, Ga.

KHAN MS, DAR O, SISMANIDIS C, SHAH K, GODFREY-FAUSSETT P. **Improvement of tuberculosis case detection and reduction of discrepancies between men and women by simple sputum-submission instructions: a pragmatic randomised controlled trial.** *Lancet.* 2007; 369(9577): 1955-60.

KOLAPPAN C, GOPI PG. **Tobacco smoking and pulmonary tuberculosis.** *Thorax.* 2002; 57(11):964-6.

KRITSKI AL, CONDE MB, MUZZY DE SOUZA GR. **Tuberculose. Do ambulatório à enfermaria.** Rio de Janeiro: Atheneu; 2000. 303p.

LEE JJ, SUO J, LIN CB, WANG JD, LIN TY, TSAI YC. **Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria.** *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7(6):569-74.

LEITRITZ L, SCHUBERT S, BÜCHERL B, MASCH A, HEESEMANN J, ROGGENKAMP A. **Evaluation of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens of a university hospital with low incidence of tuberculosis.** *J Clin Microbiol.* 2001; 39(10):3764-7.

LIBERATO, I.R.; DE ALBUQUERQUE, M.F.; CAMPELO, A.R.; DE MELO, H.R. **Characteristics of pulmonary tuberculosis in HIV seropositive and**

seronegative patients in a Northeastern region of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37(1):46-50.

LUMB R, ARDIAN M, WARAMORI G, SYAHRIAL H, TJITRA E, MAGUIRE GP, ANSTEY NM, KELLY PM. **An alternative method for sputum storage and transport for *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance surveys** Int J Tuberc Lung Dis. 2006; 10(2):172–77.

MACIEL ELN, PRADO TN, PERES RL, PALACI M, JOHNSON JL, DIETZE R. **Sputum Specimen Collection Guidance and Culture Contamination Rates in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis.** Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2008, *no prelo*.

MATSUOKA S, UCHIYAMA K, SHIMA H, SUZUKI K, SHIMURA A, SASAKI Y, YAMAGISHI F. **Relationship between CT findings of pulmonary tuberculosis and the number of acid-fast bacilli on sputum smears.** Clin Imaging. 2004;28(2):119-23.

MCDONNELL G, RUSSELL AD. **Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance.** Clin Microbiol Rev. 1999; 12(1):147–79.

METCHOCK BG, NOLTE FS, WALLACE RJ Jr. ***Mycobacterium*.** In Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C.; Yolken, R.H. (Ed). Manual of clinical microbiology. Washington: ASM Press, p. 399 – 437, 1999.

MILTGEN J, MORILLON M, KOECK JL, VARNEROT A, BRIANT JF, NGUYEN G, VERRON D, BONNET D, VINCENT V. **Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*.** Emerg Infect Dis. 2002; 8(11):1350 – 52.

MONROE PW, MUCHMORE HG, FELTON FG, PIRTLE JK. **Quantitation of microorganisms in sputum.** Appl Microbiol. 1969; 18(2):214-20.

MORGAN MA, HORSTMEIER CD, DeYOUNG DR, ROBERTS GD. **Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens.** J Clin Microbiol. 1983; 18(2): 384 – 88.

OPAS/Organización Panamericana de la Salud. **Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis.** Normas y Guías Técnica. Parte II – Cultivo, 107 p., 2008.

PABLO-MÉNDEZ A, RAVIGLIONE MC, BATTAN R, RAMOS-ZUNIGA R. **Global surveillance for antituberculosis – drug resistance 1994-1997.** World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. N Eng J Med. 1998; 338(23):1641 – 49.

PALACI M, UEKI SY, SATO DN, DA SILVA TELLES MA, CURCIO M, SILVA EA. **Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates from respiratory specimens.** J Clin Microbiol. 1996; 34(3):762-4.

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.

PALOMINO, LEÃO & RITACCO. **Tuberculosis - From basic science to patient care.** TuberculosisTextbook.com. First Edition. 2007.

PARDINI M, VARAINE F, IONA E, ARZUMANIAN E, CHECCHI F, OGGIONI M R, OREFICI G, FATTORINI L. **Cetyl-Pyridinium Chloride Is Useful for Isolation of Mycobacterium tuberculosis from Sputa Subjected to Long-Term Storage.** J Clin Microbiol. 2005; 43(1): 442– 44.

PERES RL, MACIEL ELN, MORAIS CGV, RIBEIRO FCC, VINHAS AS, JOHNSON JL, EISENACH KD, PINHEIRO CL, DIETZE R, PALACI M. **Comparison of Two Concentrations of Sodium Hydroxide in the N-acetyl-L-cysteine – Sodium Hydroxide Method for Decontamination of Sputum Specimens for Mycobacterial Smear and Culture.** Int J Tuberc Lung Dis. 2008 – *no prelo.*

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

PETERSON EM, NAKASONE A, PLATON-DELEON JM, JANG Y, DE LA MAZA LM, DESMOND E. **Comparison of Direct and Concentrated Acid-Fast Smears To Identify Specimens Culture Positive for Mycobacterium spp.** J Clin Microb. 1999; 37(11): 3564 – 68.

PFYFFER GE, WELSCHER HM, KISSLING P, CIESLAK C, CASAL MJ, GUTIERREZ J, RUSCH-GERDES S. **Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with Radiometric and Solid Culture for recovery of acid-fast bacilli.** J Clin Microbiol. 1997; 35(2): 364-368.

PIERSIMONI C, SCARPARO C, CALLEGARO A, TOSI CP, NISTA D, BORNIGIA S, SCAGNELLI M, RIGON A, RUGGIERO G, GOGLIO A. **Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study.** J Clin Microbiol. 2001; 39 (2):651-57.

PROLLA JC, PORTO NS, ULBRICH-KULCZYNSKI JM, BOGLIOLO L. **Pulmões. Pleura. Mediastino.** In: Brasileiro Filho G, Pittella JEH, Pereira FEL, Bambirra EA, Barbosa AJA. Patologia. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RAO KP, NAIR SS, COBBOLD N, NAGANATHAN N. **Some operational factors influencing the utility of culture examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis.** Bull World Health Organ. 1966; 34(4): 589-604.

RIBEIRO FKC, PERES RL, VINHAS S, CÓ TR, LECCO R, SIGLIUZI VAP, BARROS JM, DEMENECH MVA, HADDAD DJ, SAADE AAL. **The usefulness of bacteriological methods in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in the metropolitan area of Vitória-ES, Brazil.** In: Encontro Nacional de Tuberculose, 1, 2004, Brasília. Anais do I Encontro Nacional de Tuberculose, v. 1, p. 62-62.

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

RIBEIRO, FK, DETTONI VdoV, PERES RL, VINHAS SA, CÓ TR, DIETZE R, PALACI M. **Evaluation of a commercial test based on ligase chain reaction for**

direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. Rev Soc Bras Med Trop, v. 37, n. 6, p.431-435, 2004.

RIKIMARU T, KONDO M, KONDO S, OIZUMI K. **Efficacy of common antiseptics against mycobacteria.** Int J Tuberc Lung Dis. 2000; 4(6):570–76.

ROACH DR, BEAN AG, DEMANGEL C, FRANCE MP, BRISCOE H, BRITTON WJ. **TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection.** J Immunol. 2002; 168(9): 4620-7.

ROBERTS GD, GOODMAN NL, HEIFETS L, LARSH HW, LINDNER TH, McCLATCHY JK, McGINNIS MR, SIDDIQI SH, WRIGHT P. **Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens.** J Clin Microbiol. 1983; 18(3):689 – 96.

RUFFINO-NETTO A. **Tuberculosis: the neglected calamity.** Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35(1):51-8.

SCARPARO C, PICCOLI P, RIGON A, RUGGIERO G, RICORDI P, PIERSIMONI C. **Evaluation of the BACTEC MGIT 960 in comparison with BACTEC 460 TB for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 44(2): 157-61.

SCHIRM J, OOSTENDORP LA, MULDER JG. **Comparison of Amplicor, in house PCR and conventional culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples.** J Clin Microbiol. 1995; 33(12): 3221-24.

SEVERO NP, LEITE CQ, CAPELA MV, SIMÕES MJ. **Clinical and demographic characteristics of patients hospitalized with tuberculosis in Brasil between 1994 and 2004.** J Bras Pneumol. 2007; 33(5): 565-71.

SHARP S E, A ROBINSON, M SAUBOLLE, M SANTA CRUZ, K CARROLL, AND V BASELSKI. 2004. CUMITECH 7B, **Lower Respiratory Tract Infections.** Coordinating ed., S E Sharp. ASM Press. Washington, D C.

SMITHWICK RW, STRATIGOS CB, DAVID HL. **Use of Cetylpyridinium Chloride and Sodium Chloride for the Decontamination of Sputum Specimens That Are Transported to the Laboratory for the Isolation of *Mycobacterium tuberculosis*.**

J Clin Microbiol. 1975; 1(5): 411-13.

SOMOSKÖVI A, KÖDMÖN C, LANTOS A, BÁRTFAI Z, TAMÁSI L, FÜZY J, MAGYAR P **Comparison of recoveries of mycobacterium tuberculosis using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Löwenstein-Jensen medium.** J Clin Microbiol. 2000; 38(6):2395-7.

SOMOSKÖVI A, MAGYAR P. **Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with MB redox, Löwenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens.** J Clin Microbiol. 1999; 37(5): 1366-9.

STAGER CE, LIBONATI JP, SIDDIQI SH, DAVIS JR, HOOPER NM, BAKER JF, CARTER ME. **Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification.** J Clin Microbiol. 1991; 29(1):154 – 57.

STEWART GR, ROBERTSON BD, YOUNG DB. **Tuberculosis: a problem with persistence.** Nat Rev Microbiol. 2003; 1(2): 97-105.

STYBLO K. **Relación entre riesgo de infección tuberculosa y riesgo de desarrollar una tuberculosis contagiosa.** Bol Union Intern Contra Tuberc 1985; 60(3-4): 117-19.

TARANTINO AB, LEITÃO DE OLIVEIRA MC. **Tuberculose.** Arq Bras Med. 1990; 64:123-131.

TENOVER FC, CRAWFORD JT, HUEBNER RE, GEITER LJ, HORSBURGH CR Jr, GOOD RC. **The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready?** J Clin Microbiol. 1993; 31(4):767 – 70.

TOMAN K. **Tuberculosis Deteccion de casos y quimioterapia.** Organización Panamericana de la Salud Publicacion (OPAS), Publicación Científica N° 392, 1980.

TORTOLI E, CICHERO P, PIERSIMONI C, SIMONETTI MT, GESU G, NISTA D. **Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study.** J Clin Microbiol. 1999; 37(11):3578-82.

VAN SOOLINGEN D, VAN DER ZANDEN AGM, HAAS PEW, NOORDHOEK GT, KIERS A, FOUORAINE NA, PORTAELS F, KOLK AHJ, KREMER K, VAN EMBDEN JDA. **Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers.** J Clin Microbiol. 1998; 36(7):1840– 45.

WAYNE LG, KUBICA GP. **Genus Mycobacteria.** In: SNEATH PHA, MAIR NS, SHARPE ME, HOLT JG. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Vol. 2. 9th Ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986. p. 1436 – 1457.

WHITE T, CORMICAN, M, HANAHOE B, DORAN G, COLLINS T, CORBETT-FEENEY G. **Comparison of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 for culture of Mycobacteria.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 38 (2000) 123–126.

WHO Report 2003: Global Tuberculosis Control. WHO, Geneva, 2003.

WHO. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.** WHO Report 2008.

WHO. Global Tuberculosis Programme. **Laboratory services in tuberculosis control.** Geneva, 1998.

WOLINSKY E. **Nontuberculous mycobacteria and associated diseases.** Am Rev Respir Dis. 1979; 119(1):107 – 59.

Anexos

ANEXOS

Anexo I. TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

TÍTULO DE PROJETO: Avaliação do uso de anti-sépticos bucais para redução da taxa de contaminação de culturas de micobactérias em amostras de escarro de pacientes com suspeita de tuberculose

Nome do Voluntário: _____

SEUS DIREITOS

Este termo de consentimento irá informá-lo sobre a pesquisa de que você está sendo convidado a participar. Após suas perguntas e dúvidas em relação ao estudo terem sido respondidas e, se você concordar em participar do estudo, será solicitado a assinar este termo de consentimento. Você também receberá uma cópia desse documento para guardar.

A sua participação nesse estudo é voluntária. Você poderá deixar o estudo em qualquer momento. A sua decisão em não participar ou de se retirar do estudo depois de o mesmo já ter se iniciado não acarretará nenhum problema ao tratamento médico de sua doença ou de seus familiares em nosso hospital, hoje ou no futuro. Você está sendo convidado a participar deste estudo porque os médicos sabem ou suspeitam que você esteja com tuberculose (TB). Além de você, outros 89 voluntários irão participar do estudo.

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Esse estudo está sendo realizado para determinar se novos procedimentos de coleta melhoram o diagnóstico da Tuberculose. Isso é importante porque em alguns casos a sua amostra que será enviada ao laboratório pode estar contaminada por organismos da flora normal que crescem mais rapidamente que os micróbios da tuberculose. Essa contaminação com outros organismos pode afetar o diagnóstico da doença.

DURAÇÃO

Se você concordar em participar desse estudo, sua participação será inferior a uma semana, ou até fornecer ao laboratório as duas amostras de escarro.

PROCEDIMENTOS

Eu fui informado que durante o estudo ocorrerão os seguintes procedimentos:

- Eu receberei anti-sépticos bucais para realizar a higienização da boca antes de coletar as amostras de escarro.
- Eu receberei recipientes de plástico para coletar escarro que usarei para coletar todo o escarro que conseguir produzir todo dia pela manhã. Essas amostras serão encaminhadas ao laboratório onde serão realizados testes para verificar se há uma diminuição da contaminação dessas culturas. Nós acreditamos que este novo método pode melhorar ainda mais o diagnóstico da tuberculose.
- Eu entendo que será útil nesse estudo ter informações básicas sobre mim (tais como sexo e idade), e saber se eu tenho condições que podem afetar meu teste de escarro para TB.

EXCLUSÃO

Não poderão participar desse estudo, voluntários que não forem capazes de produzir escarro.

INCÔMODO / RISCO

Não há riscos de sua participação no estudo. Pode haver um leve incômodo no ato de tossir, mas esse desconforto não é maior do que o que ocorreria no fornecimento de amostras de escarro para testes clínicos convencionais.

BENEFÍCIOS

Esse novo teste pode tornar mais fácil para meu(s) médico(s) o diagnóstico da TB. É possível que eu não tenha nenhum benefício direto desse estudo, no entanto, se essa nova metodologia for melhor que a convencional ela poderá substituir a metodologia antiga e dessa forma melhorar o diagnóstico da doença. Nesse caso, este novo método poderá permitir que mais pessoas possam ser diagnosticadas e tratadas mais rapidamente, e também pode ajudar a prevenir a disseminação da TB.

CUSTOS

Você não terá despesas por participar do estudo. O diagnóstico e tratamento da tuberculose serão gratuitos e subsidiados pelos respectivos Programas Estaduais e Municipais de Controle da Tuberculose. Você não receberá nenhum tipo de pagamento pela sua participação no mesmo.

CONFIDENCIALIDADE

Todas as suas informações serão mantidas confidenciais. Você terá um número de registro e seu nome não será usado. Funcionários da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES terão permissão para consultar meus prontuários médicos e de pesquisa relacionados a esse estudo. Se as descobertas desse estudo forem publicadas seu nome ou sua identificação não serão divulgados. Sua identidade permanecerá confidencial.

Ao participar desse estudo, eu devo entender que o estudo coleta informações demográficas e sobre minha saúde. Essas informações serão registradas pelos pesquisadores e médicos que irão arquivá-los. As informações serão guardadas após o término do estudo por 6 anos como recomenda a legislação do país.

TRATAMENTO

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você será tratado de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde em sua Unidade de Saúde de origem. Este tratamento consiste no uso de 3 a 4 antibióticos tomados diariamente por no mínimo 6 meses. Se você tiver que deixar o estudo por qualquer motivo, você continuará a receber os medicamentos para tratamento de tuberculose que serão fornecidos pelo Serviço de Tuberculose onde você deverá ser acompanhado por outros médicos.

CONSENTIMENTO

A SUA PARTICIPAÇÃO NESSE ESTUDO É VOLUNTÁRIA. Você tem o direito de recusar ou de se retirar do estudo a qualquer momento sem riscos para o seu tratamento médico.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu recebi uma cópia desse termo de consentimento e sei que uma cópia ficará guardada no meu arquivo do estudo. Eu entendo que posso deixar o estudo a qualquer momento que quiser ou que o médico do estudo pode me pedir para deixar o estudo se ele entender que essa decisão é melhor para os meus interesses.

Eu entendo que se eu assinar ou colocar minha impressão digital no espaço abaixo, eu estou concordando em participar do estudo e a realizar todos os procedimentos do mesmo estabelecidos neste documento.

Assinatura do voluntário Nome do voluntário (impresso) Data/Hora

Assinatura da testemunha Nome da testemunha (impresso) Data/Hora

Eu expliquei os objetivos deste estudo para o voluntário. Tenho plena convicção que ele/ela entendeu os objetivos, riscos e benefícios da sua participação no estudo.

Assinatura do investigador Nome o investigador (impresso) Data/Hora

ANEXO II.**QUESTIONÁRIO**

Questionário para avaliar o uso de anti-sépticos bucais para redução da taxa de contaminação de culturas de micobactérias em amostras de escarro de pacientes com suspeita de tuberculose

Identificação:

Nome: _____

Identificação do Paciente no estudo: _____

Data de entrada: _____

Data de Nascimento: _____

Idade: _____ Sexo: Masculino Feminino

Endereço: _____

Município: _____ Bairro: _____

Telefone: _____

Categoria Profissional: _____

Informações Clínicas/Epidemiológicas:

1–O paciente apresenta sintomas e sinais clínicos fortemente sugestivos de tuberculose?

Sim Não

2- Caso seja afirmativo a resposta acima, quais?

Tosse Sudorese Noturna Febre Perda de Peso Mal-estar

Outros: _____

3- Rx de tórax:

- c/ cavidade Pleural
s/ cavidade Normal
Não realizado Sugestivo

Resultado fornecido por: _____

4-Possui histórico de tratamento para Tuberculose:

Sim Não

5- Agravos associados:

- AIDS Câncer Doença renal Diabetes
Tabagista Etilista Abuso de drogas

6- Qual o teste para HIV que foi realizado?

Teste rápido ELISA

7 - Qual o resultado?

Positivo Negativo Não Realizado

8- Você utiliza dentadura?

Sim Não

9- Você utiliza prótese?

Sim Não

10- Qual o tipo? Há quanto tempo?

11- Você fuma?

Sim Não

12- Qual foi a última vez que você foi ao dentista?

13- Quantas vezes você escova o dente por dia?

- 1 vez
- 2 vezes
- 3 vezes
- Mais de 3 vezes

Anexo III.

III.1 Análise dos resultados dos grupos CHX e CPC para amostras dos pacientes submetidas a concentrações de NALC- NAOH a 1,25%

Em muitos laboratórios clínicos a concentração final padrão do hidróxido de sódio utilizado é 1% para o processamento do espécime. Em países em desenvolvimento a concentração final de hidróxido de sódio varia entre 1,25% - 1,5% com o objetivo de diminuir a contaminação das culturas (KENT & KUBICA, 1985).

Os dados a seguir mostram os resultados observados após análise da taxa de contaminação das culturas obtidas a partir de amostras dos pacientes antes e após intervenção com os anti-sépticos CHX e CPC e submetidas a concentrações de NALC – NAOH a 1,25%.

A **TABELA I** e a **TABELA II** mostram a taxa de contaminação encontrada das culturas no meio sólido e líquido para amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle e do grupo de intervenção (CPC ou CHX). Como pode ser observado nessas tabelas, nas amostras controle do grupo CHX e inoculadas no meio Ogawa, a taxa de contaminação encontrada foi relativamente menor após o uso do anti-séptico CHX (8,69% e 6,52%, respectivamente). O mesmo não foi observado nas amostras controle e inoculadas no meio MGIT quando comparadas as amostras após intervenção com o anti-séptico (2,17% e 6,52%, respectivamente).

Nos resultados obtidos com a intervenção com o antisséptico CPC, foi observado uma diminuição da contaminação nas culturas controles inoculadas em meio Ogawa em relação às culturas dos pacientes que realizaram a intervenção com o anti-séptico CPC (10,0% e 4,0%, respectivamente). Apesar disso, não foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados em relação à taxa de contaminação dos resultados das culturas no meio Ogawa.

Quando analisamos a taxa de contaminação utilizando o meio MGIT, com PANTA 1X, foi observado que nas amostras controle do grupo CPC não houve uma redução na contaminação das culturas de micobactérias (10,0% e 12,0%, respectivamente).

TABELA I - Avaliação da taxa de contaminação das culturas no meio sólido e líquido para amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle e do grupo de intervenção (CHX)

Meio de Cultura	Amostras n (%)	Controle	Intervenção (CHX) [‡]	OR	IC a 95%	p valor
Ogawa	46	4 (8, 69%)	3(6, 52%)	0,5	0,008 – 9,6	1,0
MGIT 1X	46	1(2, 17%)	3(6, 52%)	0,0	0,0 – 2,41	0,500

[‡] – grupo que foi randomizado para a anti-sepsia com clorexidina.

[§] – grupo que foi randomizado para a anti-sepsia com cloreto de cetilpiridínio.

TABELA II - Avaliação da taxa de contaminação das culturas no meio sólido e líquido para amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle e do grupo de intervenção (CPC)

Meio de Cultura	Amostras n (%)	Controle	Intervenção (CPC) [§]	OR	IC a 95%	p valor
Ogawa	50	5(10, 0%)	2(4, 0%)	-	0,187 -	0,250
MGIT 1X	50	5(10, 0%)	6(12, 0%)	1,33	0,225 – 9,10	1,0

[‡] – grupo que foi randomizado para a anti-sepsia com clorexidina.

[§] – grupo que foi randomizado para a anti-sepsia com cloreto de cetilpiridínio.

III. 2 Análise comparativa dos grupos CHX e CPC em relação aos resultados de contaminação das culturas inoculadas no meio Ogawa e MGIT

Uma análise posterior foi realizada para as amostras inoculadas nos meios Ogawa e MGIT (PANTA1X), quando considerada a análise por grupo. Nas amostras inoculadas no meio Ogawa e submetidas à intervenção com o anti-séptico CHX a taxa de contaminação observada foi maior que a encontrada em relação ao grupo CPC (6,52% e 4%, respectivamente). Entretanto, não foi observada diferença

estatisticamente significativa entre os grupos de estudo, quando o meio utilizado foi o Ogawa ($p=0,5788$) (**GRÁFICO I**).

Ao analisarmos a taxa de contaminação entre os grupos CHX e CPC no meio líquido MGIT, embora tenha sido observada uma redução na taxa de contaminação nas culturas de micobactérias após a intervenção com o anti-séptico CHX em relação ao grupo CPC, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo (6,52% para 12,0%; $p=0,3574$) (**GRÁFICO I**).

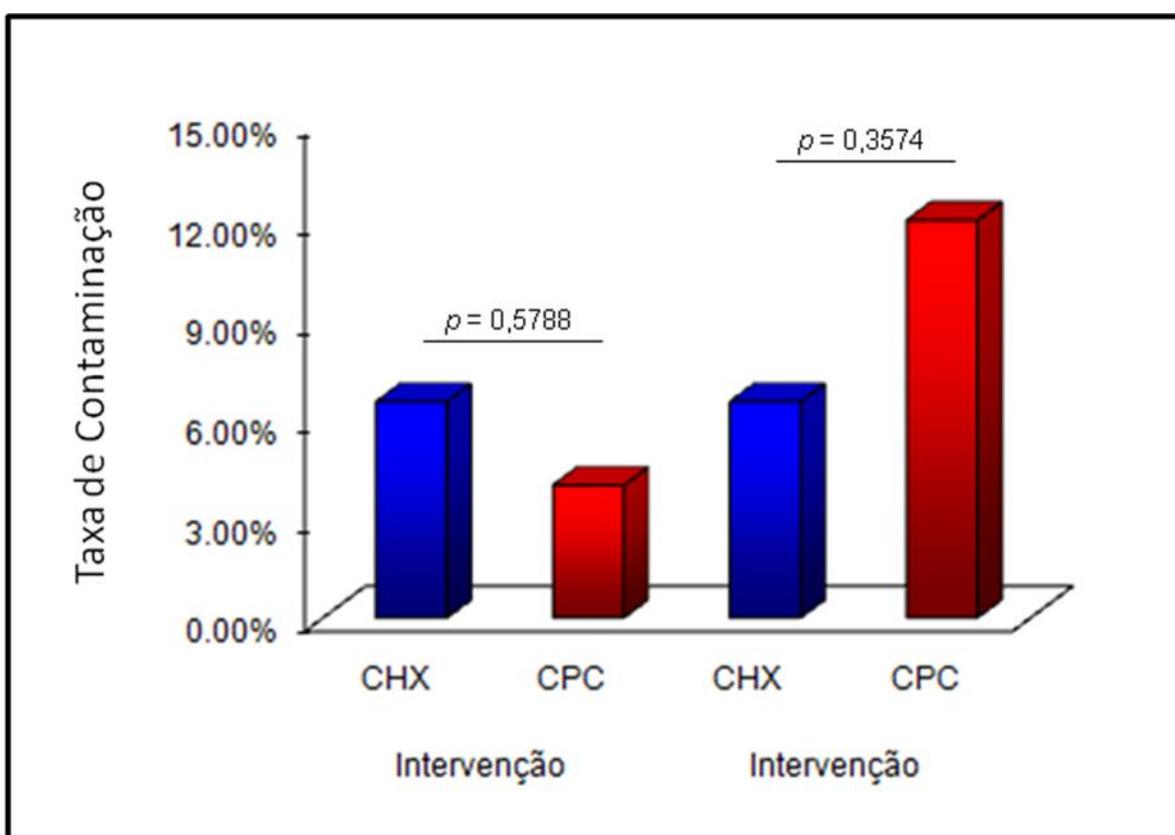


GRÁFICO I – Análise comparativa da taxa de contaminação no meio Ogawa e no meio líquido MGIT para os diferentes grupos de estudo

Para investigar os possíveis tipos de contaminação encontrada nas culturas de micobactérias, foi realizado um esfregaço das culturas contaminadas utilizando a técnica de coloração de Ziehl – Neelsen e o cultivo em placa de ágar-sangue. Após essa análise, observou-se um total de 12 culturas contaminadas no grupo CHX. Sendo que nas amostras controles do grupo CHX observou-se um predomínio de

bactérias contaminantes (50%). Entretanto, com o uso do CHX foi observado uma redução na taxa de contaminação de bactérias contaminantes (0%).

Ao analisarmos a taxa de fungos encontrada nas culturas de micobactérias, observou-se nas amostras controles do grupo CHX, uma contaminação de 33,34%. Com a utilização do anti-séptico essa taxa diminuiu para 16,66%.

Em relação à taxa de organismos contaminantes no grupo CPC, foi observado nas amostras controles 45,46% de contaminação por bactérias contaminantes. Contudo, após o uso do anti-séptico houve uma diminuição na taxa de contaminação por esses microrganismos (18,18%) (**GRÁFICO II**).

A taxa de fungos encontrada no grupo CPC foi 31,82%. Após o uso do anti-séptico foi verificado uma redução na taxa de contaminação por esses organismos contaminantes (4,54%).

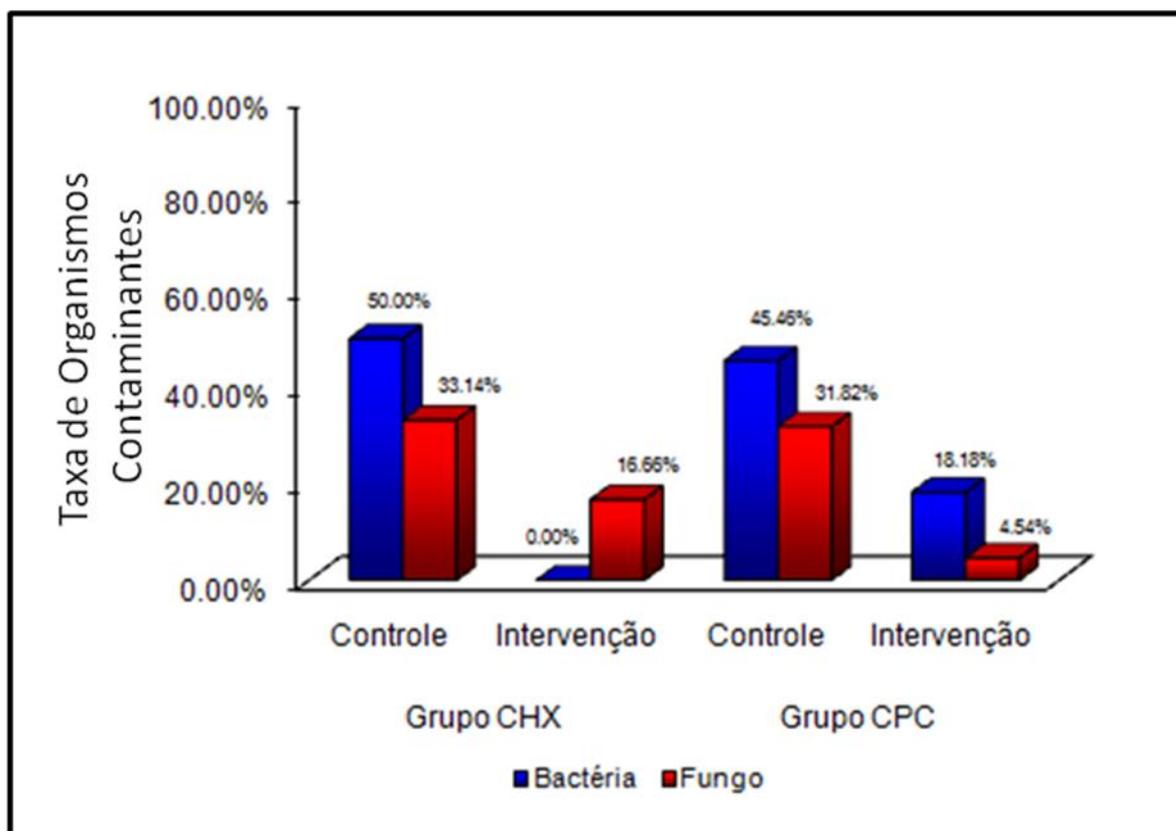


GRÁFICO II – Análise comparativa dos organismos contaminantes presente nas amostras dos pacientes para os diferentes grupos de estudo

III.3 Análise da taxa de contaminação das culturas a partir de amostras do grupo controle em meio MGIT nas concentrações de PANTA 1X e PANTA 2X

A **TABELA III** analisa a taxa de contaminação das culturas no meio líquido para amostras de escarro coletadas de pacientes após a higienização com água (grupo controle). Os resultados obtidos nessa análise mostraram, que apesar de uma concentração maior de antimicrobiano (PANTA 2X) utilizada nas amostras coletadas dos pacientes do grupo controle, à redução na taxa de contaminação das culturas de micobactérias não foi estatisticamente significativa ($p = 0,5167$).

TABELA III- Avaliação da taxa de contaminação das culturas no meio líquido para amostras de escarro coletadas de pacientes após a higienização com água (grupo controle)

Grupo de Estudo	MGIT 1X n (%)	MGIT 2X n (%)	p valor
Controle	6 (6, 25%)	4 (4, 17%)	0,5167

III.4 Análise da taxa de positividade das culturas a partir de amostras de pacientes dos grupos controle e de intervenção

Os resultados obtidos da análise da taxa de positividade das culturas no meio Ogawa e no meio MGIT para amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle estão descritas na **TABELA IV**. De um total de 96 pacientes selecionados com suspeita clínica ou radiográfica para tuberculose pulmonar, 46 (42,7%) pacientes tiveram suas culturas identificadas como *M. tuberculosis*. A taxa de positividade encontrada nas amostras do grupo controle inoculadas no meio Ogawa foi de 29,1%. Para as amostras dos pacientes submetidas à concentrações de PANTA 1X a taxa de positividade observada foi de 41,6%, enquanto nas amostras submetidas a concentrações maiores de PANTA (PANTA 2X) a positividade observada foi de 42,7%.

O tempo médio de detecção observado nas culturas inoculadas no meio Ogawa (29,1%) foi maior do que o encontrado no meio MGIT. Para as amostras de MGIT – PANTA 1X o tempo médio de detecção do bacilo foi aproximadamente de 6 dias, enquanto para as amostras submetidas a concentrações maiores de PANTA – 2X o tempo médio para detecção do bacilo foi de 8 dias.

TABELA IV - Avaliação da taxa de positividade das culturas no meio sólido e no líquido para amostras de escarro coletadas de pacientes do grupo controle

Dia de Estudo	Ogawa	DTP	MGIT 1X n (%)	DTP	MGIT 2X n (%)	DTP
Controle	28 (29, 1%)	22,57	40 (41, 6%)	6,35	41 (42, 7%)	7,87

DTP: dia de positividade

III.5 Contribuição do uso de anti-sépticos bucais para o exame de cultura de micobactérias

Das 41 culturas positivas no MGIT após a utilização do anti-séptico houve um acréscimo na detecção da cultura positiva em 5 dos pacientes em relação ao grupo controle para as culturas das amostras inoculadas em meio MGIT (PANTA 1X). Dessas, em 3 dos pacientes a cultura da amostra controle estava contaminada, e nos 2 pacientes restantes a cultura da amostra controle era negativa (**TABELA V**).

Quando o meio Ogawa foi utilizado houve um acréscimo na detecção de cultura positiva, após o uso de anti-sépticos, em 5 dos pacientes. Desses, em 3 dos pacientes a cultura do grupo controle foi negativa e, em 2 dos pacientes a cultura estava contaminada na cultura da amostra controle.

TABELA V – AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DO USO DE ANTI-SÉPTICOS BUCAIS PARA O EXAME DE CULTURA DE MICOBACTÉRIAS EM MEIO MGIT

Cultura (Grupo Controle)	Cultura no MGIT (Grupo de Intervenção)			Total
	Positiva	Negativa	Contaminada	
MGIT (PANTA 1X)				
Positiva	36	1	3	40
Negativa	2	48	0	50
Contaminada	3	2	1	6
Total	41	51	4	96

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)