

Prevalência e fatores associados à caracterização bioquímica de espécies de micobactérias isoladas de pacientes no Hospital Regional João Penido – Minas Gerais

Prevalence and factors associated with biochemical characterization of mycobacteria species isolated from patients at the Regional Hospital João Penido – Minas Gerais

Ronaldo Rodrigues da Costa¹, Thamiris Vilela Pereira², Romário Costa Fochat², Marina Oliveira Fajardo³, Marcio Roberto Silva⁴, Adalgiza da Silva Rocha⁵, Andrea Padilha de Alencar⁶, Paulo Rogério Ferreti Bonan⁷

RESUMO

Introdução: A Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV) tem ocasionado o aumento da incidência de tuberculose e de doenças por micobactérias não tuberculosas (MNT), principalmente as causadas pelo complexo *Mycobacterium avium*. **Objetivos:** Verificar a prevalência de espécies de micobactérias isoladas de pacientes do Hospital Regional João Penido (HRJP) e avaliar possíveis variáveis explicativas associadas à caracterização bioquímica dessas micobactérias. **Métodos:** Trata-se de uma análise retrospectiva dos laudos de culturas de micobactérias de pacientes assistidos no HRJP (março de 2008 a fevereiro de 2010). Foram incluídos todos os indivíduos que tiveram a espécie de micobactéria identificada por métodos bioquímicos (Laboratório Nacional Agropecuário/LANAGRO) e/ou moleculares (Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias/Fiocruz). As possíveis variáveis explicativas analisadas para a caracterização bioquímica dessas micobactérias foram: “Tipo de entrada no serviço”, “Forma clínica”, “Diagnóstico presuntivo”, “Meio de crescimento”, “Esquema de tratamento utilizado”, “Diagnóstico sorológico de HIV” e o “Número de dias de tratamento antibiótico até a coleta da amostra”. Para realizar a análise estatística descritiva e os testes univariados e multivariados de regressão logística foi utilizado o *software* Epi Info. **Resultados:** Foi verificada maior prevalência de infecções por *Mycobacterium tuberculosis* (97,1%), seguida de *Mycobacterium avium* (1,2%), *Mycobacterium avium-Mycobacterium tuberculosis* (1,2%) e *Mycobacterium bovis-Mycobacterium tuberculosis* (0,6%). “Esquema de tratamento utilizado”, “Tipo de entrada no serviço” e “Dias de tratamento até a coleta da amostra” apresentaram influência na caracterização bioquímica. **Conclusões:** Os achados evidenciaram a presença de MNT nas infecções e indicam a necessidade de observar o tratamento prévio dos pacientes.

Palavras-chave: HIV; Infecções por Micobactéria não Tuberculosa; Tuberculose.

ABSTRACT

Introduction: Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) has caused the increased incidence of tuberculosis and nontuberculous mycobacteria diseases (NTM), mainly caused by *Mycobacterium avium*. **Objectives:** To determine the prevalence of species of mycobacteria isolated from Regional Hospital João Penido/FHEMIG patients and evaluate possible variables associated with mycobacteria biochemical characterization. **Methods:** This is a retrospective analysis of mycobacterial cultures reports of patients attended at the HRJP (March 2008 to February 2010). Individuals who had the mycobacteria species identified by biochemical methods (National Agriculture Laboratory / LANAGRO) and / or molecular methods (Mycobacteria Applied Molecular Biology Laboratory / Fiocruz) were included. Possible variables associated with the biochemical characterization of mycobacteria analysed were: “Input type into service”, “Clinical form”, “Presumptive diagnosis”,

Instituição:

Hospital Regional João Penido
Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – FHEMIG
Juiz de Fora, MG – Brasil

Autor correspondente:

Ronaldo Rodrigues Costa
E-mail: ronaldo.costa@themig.mg.gov.br

“Growth medium”, “Treatment Regimen Used”, “Serological diagnosis of HIV” and “Days of antibiotic treatment before sample collection”. The software Epi Info was used to perform descriptive statistics and univariate/multivariate logistic regression tests. Results: It was found a higher prevalence of infections with *Mycobacterium tuberculosis* (97.1%), followed by *Mycobacterium avium* (1.2%), *Mycobacterium avium-Mycobacterium tuberculosis* (1.2%) and *Mycobacterium bovis-Mycobacterium tuberculosis* (0,6%). “Treatment Regimen Used”, “Input type into service” and “Days of antibiotic treatment before sample collection” had influence on biochemical characterization. Conclusions: The results show the presence of NTM in infections and indicate the need to observe the patients previous treatment.

Key words: HIV; *Mycobacterium* Infections, Nontuberculous; Tuberculosis.

INTRODUÇÃO

A microscopia direta de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), coloração de Ziehl-Nielsen, é um método rápido e barato empregado no diagnóstico da tuberculose (TB). Pela segurança e simplicidade, deve ser realizado por todo laboratório público de saúde. É considerada a técnica mais empregada no meio laboratorial, apesar da reduzida sensibilidade e especificidade.^{1,3}

A cultura é um método de maior especificidade e sensibilidade no diagnóstico da TB. Em casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% a possibilidade do diagnóstico bacteriológico.³ Contudo, mesmo sendo o padrão ouro, essa técnica apresenta a desvantagem de requerer mais de três semanas para liberação de um resultado definitivo.⁴

O aumento da prevalência de infecções pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) está relacionado com o aumento das taxas globais de incidência da TB e é o principal responsável pelo aumento da incidência de doenças por micobactérias não tuberculosas (MNT), principalmente as causadas pelo complexo *Mycobacterium avium*. Devido à baixa virulência dessa espécie, sua patogenicidade está correlacionada a maior deficiência imunológica do hospedeiro.^{2,5,7}

Entre os meios de cultura sólidos, o Lowenstein-Jensen (LJ) ou Ogawa-Kudoh são os mais utilizados e permitem uma leitura quantitativa através da contagem do número de colônias. Entretanto, esses meios prejudicam o isolamento de algumas micobactérias, como *Mycobacterium bovis*.⁸ A ausência de piruvato é prejudicial para o isolamento primário deste microrganismo.

Os métodos moleculares, como *Polymerase Chain Reaction* (PCR), também desempenham importante papel no diagnóstico diferencial da TB, apresentando sensibilidade semelhante à da cultura, com menor tempo de realização (24 horas).⁹

Os objetivos do presente estudo foram: a) determinar a prevalência de espécies de micobactérias (identificadas por métodos moleculares e bioquímicos) isoladas de pacientes atendidos no Hospital Regional João Penido (HRJP) - Juiz de Fora/MG; b) avaliar possíveis variáveis explicativas associadas à caracterização bioquímica dessas micobactérias.

MÉTODOS

Foi realizada uma análise retrospectiva de laudos do HRJP emitidos no período compreendido entre março de 2008 a fevereiro de 2010. Como critérios de inclusão foram considerados todos os pacientes com TB, que tiveram a espécie de micobactéria identificada por métodos bioquímicos e/ou moleculares. O HRJP, da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), é uma referência para o tratamento da TB na macrorregião da Zona da Mata Mineira.

Os materiais biológicos dos pacientes suspeitos de TB foram processados, previamente ao cultivo, utilizando técnicas de descontaminação (Método de DARZINS).¹¹ Posteriormente, semeados em meio LJ e Stonebrink (SB) foram observados durante o 7º, 30º, 45º e 60º dias de incubação a 36,5°C. Após 60 dias, os meios que não apresentaram crescimento de colônias características foram considerados negativos para micobactérias.

Os cultivos de LJ e SB que apresentaram o desenvolvimento de colônias características de micobactérias foram submetidos à caracterização clássica (bioquímica e fenotípica) no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), localizado em Pedro Leopoldo/MG, o qual é referência nacional no estudo de TB bovina. A caracterização molecular dos isolados foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz).¹²

Em relação à caracterização clássica de micobactérias, dentre as características de cultivo, foram observadas a morfologia colonial e o tipo de crescimento.¹³ Para a identificação bioquímica foram realizadas provas como catalase à temperatura ambiente, catalase à 68°C, niacina, nitrato, pirazinamidase, ureia e perfil de sensibilidade a fármacos.¹⁴

As possíveis variáveis explicativas analisadas para a caracterização bioquímica dessas micobactérias foram: “Tipo de entrada no serviço”, “Forma clínica”, “Diagnóstico presuntivo”, “Meio de crescimento”, “Esquema de tratamento utilizado”, “Diagnóstico sorológico de HIV” e o “Número de dias de tratamento antibiótico até a coleta da amostra”.

Foi realizada a análise estatística descritiva dos resultados de micobactérias. Modelos univariados e multivariados de regressão logística foram empregados para avaliação de possíveis fatores associados à conclusão de diagnósticos de micobactérias por caracterização bioquímica. Quanto às análises univariadas, diferenças de proporção foram verificadas por meio do teste de qui-quadrado, sendo fixado o nível de significância de 0,05. A estimativa da magnitude das associações foi feita por meio da *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* Epi Info.

O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (CEP/FHEMIG) sob o registro nº 055/2011.

RESULTADOS

O presente estudo analisou o resultado de 175 culturas de amostras positivas para micobactérias, das quais 157 (89,7%) foram submetidas a testes bioquímicos e moleculares. Dessas últimas amostras, 117

(74,5%) foram caracterizadas por ambos os testes, 21 (13,3%) foram caracterizadas por testes moleculares e 19 (12,1%) por testes bioquímicos. Dentre as 175 culturas, foram relatadas 18 (10,3%) contaminadas, sendo que destas, 13 (72,2%) tiveram a caracterização conclusiva realizada por biologia molecular.

A caracterização conjunta (bioquímica e/ou molecular) permitiu identificar em 170 (97,1%) pacientes a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, 1 (0,6%) presença de *Mycobacterium bovis-Mycobacterium tuberculosis*, 2 (1,2%) *Mycobacterium avium* e 2 (1,2%) *Mycobacterium avium-Mycobacterium tuberculosis*. A amostra identificada com a infecção conjunta por *M. bovis* e *M. tuberculosis* teve o crescimento somente em meio SB e a caracterização foi apenas por métodos bioquímicos.

Os resultados da análise univariada com possíveis variáveis explicativas para a caracterização bioquímica encontram-se na Tabela 1. As variáveis “Forma clínica”, “Diagnóstico presuntivo”, “Meio de crescimento da amostra analisada” e “Diagnóstico sorológico para HIV” não foram associados com a caracterização bioquímica ($p > 0,05$). Ao passo que as variáveis “Tipo de entrada no serviço”, “Esquema de tratamento utilizado” e “Número de dias de tratamento até a coleta da amostra”, isoladamente, tiveram associação ($p < 0,05$) com a caracterização bioquímica. Pacientes casos novos com tratamento no esquema I básico tiveram mais chances de caracterização pelo método bioquímico em comparação com os pacientes do grupo reingresso após abandono/recidivas (OR = 3,79; IC95%: 1,38 – 10,39).

Tabela 1 - Análise univariada da caracterização bioquímica de micobactérias e variáveis relacionadas de pacientes atendidos no Hospital Regional João Penido – Minas Gerais, no período março de 2008 a fevereiro de 2010

Variáveis	Total	Caracterização bioquímica			p-valor**
		Positivo	%	OR (IC95%)*	
Tipo de entrada no serviço					
Caso novo	127	113	89,0	3,79 (1,38-10,39)	<0,01
Recidiva/Reingresso após abandono	25	17	68,0	1	
Forma clínica					
Pulmonar	148	127	85,8	2,01 (0,38-10,66)	0,4
Extrapulmonar/Pulmonar e extrapulmonar	8	6	75,0	1	
Diagnóstico presuntivo					
Baciloscopia positiva	136	114	83,8	1	0,21
Baciloscopia negativa	20	19	95,0	3,66 (0,46-28,77)	
Diagnóstico sorológico para HIV					
Positivo	24	20	83,3	1	0,31
Negativo	66	60	90,9	2,00 (0,51-7,81)	

Continua...

... continuação

Tabela 1 - Análise univariada da caracterização bioquímica de micobactérias e variáveis relacionadas de pacientes atendidos no Hospital Regional João Penido – Minas Gerais, no período março de 2008 a fevereiro de 2010

Variáveis	Total	Caracterização bioquímica			p-valor**
		Positivo	%	OR (IC95%)*	
Esquema de tratamento utilizado					
Esquema I – básico	125	112	89,6	1	0,03
Recidiva/Reingresso - Esquema I – básico	17	12	70,6	0,27 (0,08-0,91)	
Falência/Esquema I reforçado	6	2	33,3	0,05 (0,01-0,34)	<0,01
Meio de crescimento da amostra analisada					
Löwenstein-Jensen	84	69	82,1	1	0,23
Stonebrink	72	64	82,9	0,57 (0,22-1,44)	
Dias de tratamento até a coleta da amostra					
Mais de um mês de tratamento (31-343)	28	19	67,9	1	0,12
Até um mês de tratamento (1-30)	23	20	87,0	3,15 (0,74-13,45)	
Nenhum dia	98	89	90,8	4,68 (1,64-13,36)	<0,01

*Odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%). **Teste de qui-quadrado com o nível de significância de 0,05.

A partir dos resultados obtidos, foi estabelecida uma variável estratificada que levasse em conta características comuns as três variáveis que apresentaram associação significativa, sendo denominada “A) Esquema de tratamento estratificado por dias de tratamento”. Esta variável teve associação ($p < 0,05$) com a caracterização bioquímica. O grupo de falência ou usando o esquema I reforçado teve 19,55 vezes (IC95%: 3,13 – 121,87) mais chances de resultados inconclusivos na bioquímica em relação aos pacientes que não tiveram nenhum tratamento até a coleta da amostra (Tabela 2).

Como verificado nos dois grupos Recidiva/Reingresso – Esquema I que, aparentemente, dias de tratamento não era o fator principal interferindo na caracte-

terização bioquímica ($p > 0,05$), esses grupos foram unificados. Com o mesmo raciocínio, os grupos sem tratamento e Esquema I (até 10 dias de tratamento) também foram agrupados. A variável resultante desta simplificação “B) Esquema de tratamento estratificado por dias de tratamento simplificado” também apresentou associação ($p < 0,05$) com a caracterização bioquímica. Os grupos Recidiva/Reingresso – Esquema I e Falência/Esquema I reforçado apresentaram, respectivamente, 4,25 (IC95%: 1,24-14,52) e 20,40 (IC95%: 3,31-125,45) vezes mais chances de resultados inconclusivos na caracterização bioquímica em relação ao grupo Sem tratamento/Esquema I (até 10 dias de tratamento) (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise univariada estratificada da caracterização bioquímica de micobactérias e variáveis relacionadas de pacientes atendidos no Hospital Regional João Penido – Minas Gerais, no período março de 2008 a fevereiro de 2010

Variáveis	Total	Negativo	%	OR (IC95%)*	p-valor**
A) Esquema de tratamento estratificado por dias de tratamento					
Sem tratamento	97	9	9,3	1	
Esquema I (até 10 dias de tratamento)	15	1	6,7	0,69 (0,08-5,94)	0,74
Esquema I em andamento (de 11 a 180 dias de tratamento)	13	3	23,1	2,93 (0,68-12,64)	0,14
Recidiva/Reingresso - Esquema I (11 a 180 dias de tratamento)	11	3	27,3	3,66 (0,82-16,32)	0,08
Recidiva/Reingresso - Esquema I (de 181 a 343 dias de tratamento)	6	2	33,3	4,88 (0,78-30,49)	0,08
Falência/Esquema I reforçado (de 30 a 222 dias de tratamento)	6	4	66,7	19,55 (3,13-121,87)	<0,01
B) Esquema de tratamento estratificado por dias de tratamento simplificado					
Sem tratamento/Esquema I (até 10 dias de tratamento)	112	10	8,9	1	
Esquema I em andamento (11 a 180 dias de tratamento)	13	3	23,1	3,06 (0,72-1,29)	0,12
Recidiva/Reingresso - Esquema I (11 a 343 dias de tratamento)	17	5	29,4	4,25 (1,24-14,52)	0,02
Falência/Esquema I reforçado (de 30 a 222 dias de tratamento)	6	4	66,7	20,40 (3,31-125,45)	<0,01

*Odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%). **Teste de qui-quadrado com o nível de significância de 0,05.

DISCUSSÃO

A caracterização conjunta (bioquímica e/ou molecular) demonstrou que a maioria das micobactérias foi identificada como *M. tuberculosis*. No entanto, é importante considerar o achado de *M. bovis* em uma amostra e de *M. avium* em quatro. Nessas amostras com MNT, três eram provenientes de pacientes HIV positivos. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Froes e colaboradores,¹⁵ no qual incluiu 66 pacientes, sendo 62 (94,0%) infectados por *M. tuberculosis* e 4 (6,0%) por MNT.

Seiscento *et al.*¹⁶ consideram que a doença pulmonar relacionada às MNT é subestimada e em muitos casos recebem tratamento como TB. Esta hipótese apoia-se no fato de não ser rotineira a identificação das micobactérias e o esquema terapêutico utilizado para o tratamento da TB apresentar eficácia parcial para as MNT. As evidências de envolvimento de MNT com os pacientes imunodeprimidos alertam os serviços de atendimento dos pacientes infectados por HIV/AIDS da importância de solicitar a caracterização micobacteriana, além do cultivo. A pesquisa direcionada às micobacterioses pode facilitar a escolha da terapia mais adequada para este grupo populacional, considerado com prognóstico desfavorável às MNT, mesmo com o avanço dos antirretrovirais.

Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre o esquema de tratamento antibiótico utilizado, dias de tratamento e tipo de entrada no serviço com a caracterização bioquímica. Possivelmente, o antibiótico usado no tratamento e a situação de entrada no serviço (reingresso após abandono/recidiva, falência) interferem na caracterização bioquímica, por alterar o metabolismo das micobactérias. Essas situações devem ser avaliadas de forma criteriosa pelos especialistas de saúde e pelos setores de diagnóstico bioquímico e fenotípico de micobactérias.

CONCLUSÃO

O presente estudo verificou a maior prevalência de *M. tuberculosis* em amostras de pacientes atendidos no HRJP, no entanto, a caracterização de *M. avium* e *M. bovis* indica a presença de MNT nas infecções.

As variáveis explicativas relacionadas com a caracterização bioquímica revelaram as interferências do esquema antibiótico utilizado, do tipo de entrada no serviço (caso novo ou recidivo) e do tempo de tra-

tamento até a coleta da amostra. Esses achados podem contribuir para o estabelecimento de protocolos da caracterização bioquímica de micobactérias que levem em consideração a situação prévia de tratamento do paciente.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (410595/2006-3).

REFERÊNCIAS

1. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Rev Saúde Pública*. 1999; 33(3):281-6.
2. Calsolari RAO. Diagnóstico laboratorial de *Mycobacterium* spp. em Botucatu e região, utilizando a técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em material biológico e avaliação de condições associadas [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2016.
3. Ministério da Saúde (BR). Manual de Recomendações para o controle de tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
4. Siqueira HR. Enfoque clínico da tuberculose pulmonar. *Pulmão*. 2012; 21(1):15-8.
5. Zamarioli LA, Coelho AGV, Pereira CM, Ferrazoli L, Bammann RH. Identificação laboratorial de micobactérias em amostras respiratórias de pacientes HIV-positivos com suspeita de tuberculose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(3):290-7.
6. Oliveira EMD, Moraes ZM, Tabata R, Dias RA, Oliveira RS, Leão SC, *et al.* Avaliação da virulência em hamsters (*Mesocricetus auratus*) de estirpes de *Mycobacterium avium* presentes na população de suínos do sul do Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2002; 39(4):202-7.
7. Saad MHF, Vincent V, Dawson DJ, Palaci M, Ferrazoli L, Fonseca LS. Analysis of *Mycobacterium avium* complex serovars isolated from AIDS patients from Southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(4):471-5.
8. Rocha A, Elias AR, Sobral LF, Soares DF, Santos AC, Marsico AG, *et al.* Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011; 91(1):14-21.
9. Ogusku MM, Salem JI. Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no Estado do Amazonas. *J Bras Pneumol*. 2004; 30(4):433-9.
10. Organización Panamericana de la Salud. Manual de bacteriología de la tuberculosis, técnicas y procedimientos básicos. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 1973.
11. Drobniewski F, Strutt M, Smith G, Magee J, Flanagan P. Audit of scope and culture techniques applied to samples for the diagnosis

- of *Mycobacterium bovis* by hospital laboratories in England and Wales. *Epidemiol Infect.* 2003; 130(2):235-7.
12. Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(2):406-9.
 13. David H, Brum L, Prieto E. Manual de micobacteriologia em saúde pública: princípios e métodos. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical; 1994.
 14. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control; 1985.
 15. Froes GC, Coutinho RL, Ávila MN, Caçado LR, Miranda SS. Perfil e seguimento dos pacientes portadores de *Mycobacterium* sp. do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. *J Pneumologia.* 2003; 29(6):365-70.
 16. Seiscento M, Bombarda S, Carvalho AC, Campos JRM, Teixeira L. Derrame pleural por micobactéria não tuberculosa. *J Bras Pneumol.* 2005; 31(5):459-63.
-