
**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA
SUSCEPTIBILIDADE A DROGAS DE MICOBACTÉRIAS
ISOLADAS DE PACIENTES COM A SÍNDROME DA
IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA ATENDIDOS EM
HOSPITAL DE REFERÊNCIA PARA AIDS EM GOIÁS,
BRASIL¹**

Débora Lemos Maldi Maia,² Lilian de Souza² e Cleômenes Reis³

RESUMO

Após consentimento livre e esclarecido, foram coletadas e analisadas, bacteriologicamente, 116 amostras (líquor, escarro, lavado brônquico, biópsia/punção de gânglio, urina, sangue, biópsia hepática, aspirado de medula óssea e líquido pleural), provenientes de 87 portadores de aids internados ou em acompanhamento no Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás (HDT). O material foi submetido à baciloscopia pela técnica de Ziehl-Neelsen e à cultura em dois meios: Löwenstein-Jensen, L-J, (sólido) e sistema bifásico, BI, (sólido/líquido). A descontaminação foi processada pelos métodos de Petroff e lauril-sulfato de sódio (SDS). A identificação das micobactérias foi realizada através de provas de crescimento em presença de inibidores, produção de pigmento, tempo de crescimento e provas bioquímicas. Determinou-se a susceptibilidade às drogas antimicobacterianas em todas as cepas de *M. tuberculosis* obtidas. Foram isoladas micobactérias em 12 (10,3%) das 116 amostras analisadas. Dentre os 12 isolados, nove, provenientes de oito pacientes, foram identificados como *M. tuberculosis* e os demais, de dois pacientes, como pertencentes ao complexo *M. avium* (MAC). Uma das cepas de *M. tuberculosis*, obtida de líquido, mostrou-se resistente à estreptomomicina e outra, de escarro com baciloscopia negativa, apresentou resistência a rifampicina, isoniazida, pirazinamida, estreptomomicina, etambutol e etionamida. Das 12 culturas positivas, seis tiveram baciloscopia negativa e o isolamento de duas cepas de MAC só aconteceu no material descontaminado pelo método SDS. Quanto à eficiência dos meios de cultura, não foi possível observar diferença entre os meios L-J e BI.

UNITERMOS: Micobactérias. Tuberculose. Aids.

1 Dissertação apresentada pela primeira autora ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical, área de concentração: Microbiologia.

2 Professoras Adjuntas do Departamento de Microbiologia da Universidade Católica de Goiás.

3 Professor Titular do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do IPTSP, UFG.

Endereço para correspondência: Rua Delenda Rezende de Melo esq. com 1ª Avenida, Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, GO.

Recebido para publicação em 28/3/2000. Revisto em 26/7/2000. Aceito em 28/12/2000.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que 1,7 bilhão de pessoas, quase um terço da população mundial, estejam infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Esses indivíduos mantêm o ciclo da infecção provocando, anualmente, o aparecimento de 8 milhões de novos casos de tuberculose e 2,9 milhões de mortes (2, 26).

Sendo a tuberculose uma doença infecciosa sob controle da imunidade celular, situações que comprometem essa imunidade, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), levam o indivíduo a um maior risco de desenvolver a tuberculose ativa, com base em uma infecção latente. Uma vez que a epidemia pelo HIV está em rápida expansão, especialmente naqueles países onde é alta a prevalência de tuberculose, a infecção pelo HIV é o mais potente fator de risco para o desenvolvimento da tuberculose (6, 32). No mundo todo, calcula-se em 3,1 milhões o número de pessoas infectadas simultaneamente pelo *M. tuberculosis* e pelo HIV (49). No Brasil, cerca de 20% dos pacientes com a síndrome da imunodeficiência humana (aids) apresentam tuberculose (29). Dessa forma, a tuberculose é freqüentemente a primeira manifestação da infecção pelo HIV e recomenda-se a realização de testes sorológicos para HIV em todos os pacientes com diagnóstico de tuberculose, assim como está indicada a investigação de infecção pelo *M. tuberculosis* em todos os pacientes HIV soropositivos (10, 75).

A epidemia provocada pelo HIV contribuiu também para o desenvolvimento e disseminação de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas, MDR (13, 48, 79). Pacientes com aids apresentam características que levam ao abandono do tratamento, tais como as alterações neuropsíquicas e o uso concomitante de outras drogas (21, 37, 76). Além disso, os efeitos colaterais das drogas utilizadas no tratamento da tuberculose são mais freqüentes nos pacientes HIV soropositivos (66). Portanto, a infecção pelo HIV influiu, não apenas elevando o número de casos de tuberculose, mas também aumentando a dificuldade de seu tratamento.

A tuberculose pode ser identificada presuntivamente através da baciloscopia positiva do escarro, dos líquidos corporais ou tecidos, ou por uma combinação de sintomas clínicos, anormalidades no raio X torácico e teste tuberculínico positivo. Contudo, o diagnóstico definitivo requer o isolamento e a identificação de bactérias do complexo *M. tuberculosis* (47). Uma variedade de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, dentre elas a reação da polimerase em cadeia (PCR), apresenta potencial para fornecer essas informações dentro de 24 a 48 horas. Entretanto, têm sido relatados vários problemas, inclusive a inibição da amplificação da PCR, com taxas de inibição variando de 3% a 15% (19, 25, 26, 44, 52, 69). Outro importante obstáculo é o elevado custo e a necessidade de pessoal qualificado e

equipamento específico, o que faz com que essa metodologia venha se juntar aos procedimentos convencionais de microscopia e cultura, mas não substituí-los (53). Portanto, o isolamento da micobactéria em cultura, permanece o mais confiável método de diagnóstico, constituindo o indispensável ponto de partida para a sua identificação e para o teste de susceptibilidade a drogas (72). Dentre os meios de cultura disponíveis, os meios sólidos desempenham um papel preponderante, não só por seu baixo custo e elevada eficiência, mas também porque, em muitos casos, permitem o rápido reconhecimento de contaminantes e culturas mistas. Porém, vários autores têm recomendado que, para um ótimo isolamento de micobactérias com base em espécimes clínicos, deve-se utilizar um meio líquido, paralelamente a um meio sólido. Destes, um dos mais recomendados é constituído por um meio sólido (Löwenstein-Jensen, 7H-10 ou 7H-11) e outro líquido (7H-9), denominado sistema bifásico (12, 72, 77).

Ao contrário do que acontece no Brasil, onde o *M. tuberculosis* é o agente micobacteriano mais freqüentemente encontrado nos pacientes com aids (29), nos EUA, as bactérias que mais provocam infecções nesses pacientes são as micobactérias do complexo *M. avium* (MAC), as quais aparecem em 20-40% dos casos. A maioria desses indivíduos apresenta doença disseminada e menos de 5%, doença pulmonar localizada (34, 35, 40, 50, 51).

O diagnóstico de doença disseminada por *M. avium* é confirmado mais freqüentemente pelo isolamento da bactéria através do sangue, sendo que uma única cultura tem sensibilidade de aproximadamente 90%, o que torna desnecessária a realização de culturas repetidas. A repetição de culturas é indicada apenas quando a primeira é negativa (1). Já o diagnóstico de doença pulmonar por *M. avium* pode ser estabelecido associando-se critérios clínicos, radiológicos e bacteriológicos. A avaliação mínima deve incluir três ou mais amostras de escarro positivas para bacilos álcool-ácido-resistentes e a exclusão de outras desordens, tais como tuberculose e câncer de pulmão. Essa preocupação deve-se ao fato de que, além de as micobactérias do grupo NTM (*non tuberculous mycobacteria*) serem comumente encontradas na natureza, algumas pesquisas apresentam indícios de que o trato respiratório pode ser colonizado com essas bactérias, sem que o indivíduo apresente sintomas. Isso ocorre particularmente nos pacientes com doença respiratória crônica (30, 55, 78).

O prognóstico para o paciente com aids infectado por micobactérias do complexo MAC é sombrio. Na realidade, o aumento da prevalência das micobacterioses colocou em evidência antigos problemas relacionados com sua quimioterapia, incluindo: 1) demora na informação sobre a susceptibilidade ou resistência a drogas, 2) insucesso na quimioterapia e 3) falta de correlação entre os dados obtidos no laboratório, relativos à resistência ou susceptibilidade e sucesso ou fracasso da terapia. Alguns

desses problemas resultam do fato de que as NTM são parasitas intracelulares e, assim, a susceptibilidade *in vitro* pode não refletir o que ocorre no hospedeiro. Adicionalmente, há evidências de que uma proporção substancial de pacientes com aids é infectada por mais de uma cepa de bactéria do complexo *M. avium*, ou seja, a infecção é policlonal. A situação é agravada pelo fato de ainda faltar informações, tanto sobre o mecanismo de ação das drogas, quanto sobre o mecanismo da resistência, o qual, na maioria das vezes parece estar mais relacionado à impermeabilidade do envoltório celular do que a modificações genéticas. Além disso, ainda há a necessidade de se identificarem alvos potenciais para a quimioterapia e de se desenvolverem novas e eficazes drogas antimicobacterianas e regimes terapêuticos (42, 48, 60, 80).

Apesar de a doença disseminada por bactérias do complexo MAC ter emergido como uma complicação comum, debilitante e potencialmente fatal da doença provocada pelo HIV, existem relatos de isolamento de outras espécies de NTM através de pacientes com aids. Os dados indicam que, nos EUA, cerca de 50% dos pacientes com aids podem se infectar com bacilos álcool-ácido-resistentes em alguma etapa da doença (20). Dentre as demais espécies, estão incluídas: *M. kansasii* (36, 43, 67), *M. scrofulaceum* (36), *M. goodii* (36), *M. haemophilum* (43, 45), *M. genavense* (11), *M. celatum* (14), *M. conspicuum* (70), *M. xenopi* (3), *M. fortuitum* (36,62), *M. marinum* (61), *M. malmoense* (39) e *M. simiae* (38). Essas bactérias podem provocar doença pulmonar e/ou disseminada nos pacientes com aids. Na falta de critérios para o diagnóstico de doença pulmonar provocada por essas espécies, a American Thoracic Society (ATS) recomenda a utilização dos mesmos critérios aplicáveis no diagnóstico da doença pulmonar causada pelo *M. avium* (1).

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram:

- 2.1) Pesquisar a presença de micobactérias em espécimes clínicos de pacientes portadores de aids atendidos em Hospital de Referência do Estado de Goiás.
- 2.2) Identificar as espécies de micobactérias isoladas e determinar a susceptibilidade do *M. tuberculosis* aos agentes antituberculosos.
- 2.3) Verificar a concordância entre baciloscopia e cultura como forma de diagnóstico para tuberculose e micobacterioses.
- 2.4) Comparar a eficiência de dois métodos de descontaminação: lauril sulfato de sódio (SDS) e Petroff e de dois meios de cultura: Löwenstein-Jensen e Sistema Bifásico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi realizada com pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Humana (aids), atendidos no Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás (HDT), tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital. Foram analisadas 116 amostras provenientes de 87 pacientes, no período de agosto de 1995 a março de 1996. Nesse estudo, foram incluídos apenas os pacientes que já manifestavam a síndrome da imunodeficiência e com pedido médico de pesquisa de micobactérias. O espécime clínico analisado foi definido pelo médico solicitante, tendo como base a suspeita clínica e/ou a necessidade de realização de procedimentos invasivos.

Após a coleta, as amostras eram adequadamente condicionadas e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTESP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), onde foram analisadas.

Os espécimes enviados em quantidade suficiente foram submetidos diretamente à bacterioscopia pelo método de Ziehl-Neelsen e, após tratamento, à cultura para micobactérias. Para o tratamento, foram utilizados dois métodos: o de Petroff, que usa solução de NaOH a 4%, e do lauril sulfato de sódio (SDS), que associa solução de NaOH a 1% com um agente tensoativo, o dodecil ou lauril sulfato de sódio. Amostras sépticas consideradas multibacilares foram descontaminadas pelo método de Petroff, enquanto as consideradas paucibacilares foram tratadas pelo SDS, de acordo com Brasil (12). Os espécimes descontaminados pelo método de Petroff foram inoculados simultaneamente em quatro tubos, sendo que dois continham meio sólido de Löwenstein-Jensen (L-J) e os outros dois, o sistema bifásico, constituído pelo meio de L-J associado ao meio líquido 7H-9. Tanto as amostras assépticas, quanto as descontaminadas pelo SDS foram inoculadas apenas em dois tubos do sistema bifásico.

As culturas que apresentaram crescimento foram submetidas a bacterioscopia por Ziehl-Neelsen para confirmação da presença de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) e, posteriormente, encaminhadas para o Instituto de Saúde do Distrito Federal, em Brasília, ou para o Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, no Rio de Janeiro, para a identificação da espécie e teste de susceptibilidade a drogas. A identificação foi realizada com base em provas bioquímicas, de crescimento, em presença de agentes inibidores, tempo de crescimento e produção de pigmento, conforme Brasil (12) e Tsukamura, 1984 (73).

As cepas de *M. tuberculosis* isoladas foram submetidas ao teste de susceptibilidade às seguintes drogas: etambutol (EMB), isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA), estreptomicina (SM) e etionamida

(ETH). O teste foi realizado pelo método das proporções segundo Canetti et al. (15).

4. RESULTADOS

Das 116 amostras cultivadas, 12 (10,3%) resultaram positivas. Isolou-se micobactéria em uma das 50 amostras de líquido analisadas, em cinco de 22 escarros, em duas de 20 lavados brônquicos e em quatro de oito biópsias ou punções de gânglio. A maior positividade ocorreu no material proveniente de gânglio: de oito amostras processadas, quatro (50%) foram positivas. Por outro lado, das 50 amostras de líquido, apenas uma (2%) resultou em cultura positiva. A Tabela 1 apresenta todos os espécimes analisados.

Tabela 1. Distribuição das 116 amostras com relação ao espécime clínico, número de culturas positivas, percentagem de positividade em relação ao número de amostras de cada espécime e percentual de positividade em relação às culturas positivas

Espécime clínico	Nº de amostras	Nº de culturas positivas	% de positividade em relação ao número de amostras por espécime	% de positividade em relação às 12 amostras com cultura positiva
Líquor	50	1	2,0	8,3
Escarro	22	5	22,7	41,7
Lavado brônquico	20	2	10,0	16,7
Biópsia/Punção de gânglio	8	4	50,0	33,3
Urina	6	0	0,0	0,0
Biópsia hepática	4	0	0,0	0,0
Sangue	4	0	0,0	0,0
Aspirado de medula óssea	1	0	0,0	0,0
Líquido pleural	1	0	0,0	0,0
TOTAL	116	12	-	100,0

Das 12 cepas de micobactérias isoladas, 9, provenientes de 8 pacientes, foram identificadas como *M. tuberculosis* e 3, obtidas de 2 pacientes, pertenciam ao complexo *M. avium*.

A baciloscopia foi realizada em 95 amostras, dando resultado positivo em três deles (3,2%). Das amostras com cultura positiva, seis (50%) tiveram baciloscopia negativa.

O teste de susceptibilidade às drogas foi realizado em todos os isolados de *M. tuberculosis*. Uma amostra MDR, obtida de escarro, apresentou resistência à rifampicina, pirazinamida, isoniazida, etambutol, estreptomicina e etionamida. A única amostra isolada de líquido mostrou resistência à estreptomicina. As demais bactérias mostraram-se susceptíveis a todas as drogas testadas.

Na Tabela 2, observamos que, das três cepas de bactérias do complexo *M. avium*, duas foram isoladas somente após a descontaminação pelo método SDS.

Tabela 2. Distribuição das 12 amostras com cultura positiva, conforme espécime clínico, método de descontaminação, espécie de micobactéria isolada e resultado da baciloscopia

Amostra	Métodos de descontaminação Petroff SDS	Bactéria isolada	Baciloscopia
Escarro	C+ C+	<i>M. tuberculosis</i>	(+)
Escarro	C+ C+	<i>M. tuberculosis</i>	(+)
Escarro	C+ C+	<i>M. tuberculosis</i> ^a	(-)
Escarro*	C+ NR	<i>M. tuberculosis</i>	(-)
Punção de gânglio*	NR C+	<i>M. tuberculosis</i>	NR
Punção de gânglio	NR C+	<i>M. tuberculosis</i>	(+)
Biópsia de gânglio	NR C+	<i>M. tuberculosis</i>	NR
Biópsia de gânglio	NR C+	<i>M. tuberculosis</i>	NR
Líquor	NR NR	<i>M. tuberculosis</i> ^b	(-)
Lavado brônquico**	C+ C+	MAC	(-)
Escarro**	C - C+	MAC	(-)
Lavado brônquico	C - C+	MAC	(-)

C+ = cultura positiva; C - = cultura negativa; NR = não realizado; MAC = complexo *M. avium*; * = amostras provenientes do mesmo paciente; ** = amostras provenientes do mesmo paciente; a = cepa resistente à rifampicina, pirazinamida, isoniazida, etambutol, estreptomicina e etionamida; b = cepa resistente à estreptomicina.

Na Tabela 3, observa-se que dos quatro espécimes considerados paucibacilares cultivados simultaneamente em meio sólido de L-J e sistema bifásico (líquido/sólido), todos cresceram em meio de L-J, enquanto apenas três cresceram no sistema bifásico.

Tabela 3. Comportamento das quatro amostras inoculadas simultaneamente nos meios de cultura de L-J e sistema bifásico

Amostra	Meios de Cultura	
	L-J	Bifásico
Líquor	(+)	(+)
Punção de gânglio	(+)	(+)
Biópsia de gânglio	(+)	(-)
Biópsia de gânglio	(+)	(+)

5. DISCUSSÃO

No Brasil, quase a totalidade das micobactérias isoladas de pacientes com aids são *M. tuberculosis* (17). Nesta pesquisa, de 10 pacientes com cultura positiva para micobactérias, 8 (80%) apresentaram *M. tuberculosis* e 2 (20%), complexo *M. avium*. Considerando-se que, dos 87 pacientes com aids que participaram da pesquisa, 10 já apresentavam diagnóstico de tuberculose previamente estabelecido e encontravam-se sob tratamento específico, eleva-se para 18 (20,7%) o número de indivíduos apresentando co-infecção HIV / *M. tuberculosis*. No Brasil, aproximadamente 12,8% dos pacientes com aids manifestam diferentes formas de tuberculose no momento da notificação, porém, tratando-se de uma enfermidade endêmica, esse número tende a aumentar à medida que progridem os efeitos da infecção pelo HIV. No Estado de São Paulo, há registros de 33,3% de tuberculose entre os pacientes com aids (56,57). Em outros locais do mundo onde a tuberculose é também endêmica, a frequência dessa associação é igualmente elevada: 41,6% em Barcelona (16), 60% na África e no Haiti (24,28,58,63,74). Já nos Estados Unidos, um país de baixa endemicidade para tuberculose, a taxa de co-infecção HIV / *M. tuberculosis* encontrada em um estudo realizado por Casabona et al. foi de 5-10% (16).

Verifica-se a superioridade da cultura sobre a baciloscopia na identificação de casos de tuberculose, quando se observa que, das quatro amostras de escarro das quais se isolou *M. tuberculosis*, duas tiveram

baciloscopia negativa (Tabela 2). Cultura positiva com baciloscopia negativa é um achado comum nos casos de aids porque os pacientes freqüentemente apresentam zonas de infiltrados pulmonares menores (46,71,74). As conclusões apresentadas por Pitchenick & Rubinson (59) destacam a relevância da cultura no diagnóstico da tuberculose em pacientes com aids, pois, nesses pacientes, o padrão da radiografia do tórax assemelha-se freqüentemente ao da tuberculose primária, contudo, ao contrário da tuberculose primária, as culturas de escarro para o *M. tuberculosis* são geralmente positivas. Outra importante observação é que, em muitos casos, a radiografia do tórax é normal, porém a cultura para *M. tuberculosis* é positiva.

O resultado da cultura é influenciado tanto pelo método empregado na descontaminação da amostra, como pelo meio de cultura utilizado (1,4,72,77). Neste estudo, o isolamento de duas cepas de *M. avium-intracellulare*, uma de escarro e outra de lavado brônquico, só aconteceu quando se usou solução aquosa de NaOH a 1% associada ao lauril sulfato de sódio (SDS). Os mesmos espécimes, tratados pela técnica de Petroff, de custo mais baixo e tradicionalmente empregada, em que a amostra é misturada volume a volume com uma solução aquosa de NaOH a 4%, forneceram cultura negativa. Esse procedimento mais agressivo inativa cerca de 70% das micobactérias, não devendo ser utilizado nem em espécimes paucibacilares, nem em material suspeito de conter NTM, uma vez que elas são mais sensíveis ao NaOH (1,12). Nossos resultados não nos permitiram concluir que os meios líquidos são mais eficientes do que os meios sólidos (Tabela 3), o que aponta para a necessidade da realização de novos estudos com um número maior de amostras, já que há registros de diferenças significativas de sensibilidade entre o meio L-J e outros sistemas de cultivo para micobactérias (4,72,77).

É freqüentemente observado e bastante divulgado o fato de que em pacientes com aids o quadro clínico da tuberculose é diferente daquele visto normalmente em pacientes adultos com tuberculose. Esse quadro pode incluir manifestações pulmonares não usuais, envolvimento ganglionar disseminado e tuberculomas intracerebrais (33,74). Há registros de que, em cerca de 70% dos casos, a tuberculose em pacientes infectados pelo HIV tem localização extrapulmonar (5). Em nosso estudo, das nove culturas positivas para *M. tuberculosis*, quatro foram obtidas de escarro, quatro de material ganglionar e uma de líquido. A importância da busca de *M. tuberculosis* em material proveniente de gânglios fica evidente: de oito espécimes ganglionares submetidas ao cultivo, quatro (50%) tiveram cultura positiva. Nesta pesquisa, a baixa prevalência de micobactérias em líquido, um isolado em 50 amostras cultivadas, assim como a ausência de isolados em outros materiais devem-se provavelmente aos seguintes fatores: 1) nos pacientes com aids atendidos no HDT, a pesquisa de bacilos álcool-ácido-resistentes é realizada em todo

material obtido por procedimentos invasivos, independente de o paciente apresentar sintomatologia específica e, 2) no momento da coleta das amostras, 10 pacientes encontravam-se sob tratamento específico para tuberculose.

A estratégia mais importante e universalmente aplicada no controle da tuberculose é a identificação precoce dos casos e seu tratamento adequado. Por tratamento adequado, entende-se o uso correto das drogas pelos pacientes, assim como a administração de drogas às quais o *M. tuberculosis* seja sensível. Os relatos de micobactérias resistentes a drogas remontam ao início do uso da monoterapia com estreptomicina em 1944 (33). Nos EUA, os levantamentos mostram estabilidade ou declínio da proporção de pacientes com tuberculose resistente a drogas no período entre 1950 e 1986, porém, na década de 1980, aumentou de 7,0% para 14,2% a frequência de isolados de *M. tuberculosis* resistentes a uma ou mais drogas antituberculosas (27,41). Em 1991, na cidade de Nova York, Frieden et al. (27) verificaram um aumento de 130% na proporção dos casos de tuberculose virgens de tratamento e resistentes a drogas, sendo que a maior proporção deles estava entre os pacientes infectados pelo HIV. Os pesquisadores consideraram três possíveis explicações para o fato: 1) os pacientes HIV soropositivos, por exemplo, os usuários de drogas injetáveis, podem estar mais expostos a indivíduos portadores de *M. tuberculosis* resistentes e, assim, se infectam ou reinfectam com esses organismos; 2) pacientes HIV soropositivos com *M. tuberculosis* MDR podem estar mais predispostos a desenvolver a doença do que indivíduos imunocompetentes e 3) após a infecção por uma bactéria MDR, a doença progrediria mais rapidamente nas pessoas infectadas pelo HIV do que nas pessoas não infectadas. O problema da resistência foi registrado também no Haiti e Porto Rico, onde até 30% das cepas de *M. tuberculosis* isoladas são resistentes (31,64). No Brasil, no período entre 1992-1994, de 228 pacientes com a associação aids/ *M. tuberculosis*, 47 (20,6%) estavam infectados com bactéria resistente a uma ou mais drogas antituberculosas (57). No Estado de São Paulo, em 1.414 amostras de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes sob tratamento entre 1986-1990, 660 (46,6%) eram resistentes a uma ou mais drogas (68). A identificação dos pacientes portadores de cepas MDR é crítica, uma vez que esses poderão transmitir-las a seus contatos, principalmente durante a admissão hospitalar, caso não sejam adotadas medidas de prevenção. São vários os relatos de surtos hospitalares de tuberculose, com elevadas taxas de mortalidade entre os infectados pelo HIV, sendo que, em um deles, constatou-se, através de análise do DNA, que 37% dos pacientes com aids desenvolveram tuberculose primária dentro de cinco meses após a exposição a um paciente bacilífero (7, 9, 18, 22, 23, 54, 65). Os surtos hospitalares de tuberculose MDR em pacientes infectados pelo HIV mostram o potencial para a transmissão de um tipo de tuberculose que pode ser rapidamente fatal. Um fator que contribui

decisivamente para isso é a demora em reconhecer a presença de uma cepa resistente, assim como a falha em observar as precauções recomendadas de isolamento do paciente e ventilação apropriada com pressão negativa nas salas e quartos de isolamento (23,54). Considerando-se o exposto, é extremamente preocupante a presença de uma cepa resistente à estreptomicina (proveniente de líquido) e outra MDR (de escarro), resistente à rifampicina, pirazinamida, isoniazida, estreptomicina, etambutol e etionamida, entre as nove cepas de *M. tuberculosis* isoladas.

Em todos os locais onde é elevada a prevalência de *M. tuberculosis* na população, é pequena a participação das demais micobactérias nas infecções associadas à aids. No Brasil, Barreto et al. (8), em pesquisa realizada em vários Estados, entre os anos de 1990-1992, isolaram bactérias do grupo NTM de 46 pacientes. Desses, 33 (71,7%) apresentaram doença pulmonar crônica, sendo que nove deles (27%) eram positivos para HIV. Assim, o isolamento de três cepas de bactérias do complexo *M. avium* a partir de apenas dois dos 87 pacientes que fizeram parte de nosso trabalho está de acordo com os relatos da literatura. Em um dos pacientes, a bactéria foi isolada a partir de dois espécimes diferentes, escarro e lavado brônquico e, em outro, o isolamento ocorreu a partir do cultivo de lavado brônquico. A ATS considera o lavado brônquico mais sensível do que o escarro para o isolamento de NTM, contudo, sua especificidade para indicar doença clínica ainda é desconhecida (1). A interpretação do isolamento de NTM no escarro de pacientes HIV soropositivos constitui um problema particular, uma vez que esses pacientes frequentemente apresentam-se infectados por NTM sem evidência de doença pulmonar. Esse quadro pode ser transitório, mas também pode refletir doença disseminada ou doença pulmonar subclínica. Nos EUA, cerca de um terço de todos os pacientes HIV soropositivos com doença disseminada por MAC tiveram fezes ou escarro positivos para bacilos álcool-ácido-resistentes. Portanto, a ATS não recomenda a pesquisa rotineira desses agentes nas fezes e escarro, contudo, enfatiza que um histórico de cultura positiva em um desses materiais inspira cuidados com relação à disseminação futura (1).

SUMMARY

Detection, identification and susceptibility to antimycobacterial drugs of mycobacteria from patients with the acquired immunodeficiency syndrome at an AIDS Reference Hospital in Goiás, Brazil.

In the present study, 116 samples, including cerebrospinal fluid, sputum, bronchoscopy specimens, lymph node biopsy, urine, blood, liver biopsy, bone marrow aspirate and pleural liquid were obtained from AIDS in-patients or out-patients followed-up at Hospital de Doenças Tropicais do Estado de

Goiás (HDT). Samples were processed for detection of mycobacteria. Acid-fast bacillus (AFB) was detected by conventional Ziehl-Neelsen method and cultures were performed by inoculation into a solid medium, Löwenstein-Jensen (L-J), and biphasic system (BI), consisting of a solid medium (L-J) associated to a liquid medium (7H9). Before culturing, samples were digested and decontaminated with sodium dodecyl sulphate (SDS) and by the Petroff method. Species identification was based on growth in the presence of inhibitory agents, growth rates, colony pigmentation and biochemical tests. *M. tuberculosis* isolates were tested for susceptibility to antimycobacterial drugs. Tests were performed on L-J by the proportion method established by Canetti. The 116 samples yielded 12 isolates (10,3%). These 12 isolates, included nine *M. tuberculosis* (from eight patients) and three *M. avium* complex (MAC) strains (from two patients). *M. tuberculosis* recovered from cerebrospinal fluid was resistant to streptomycin and another one, from a smear-negative sputum, was resistant to rifampicin, isoniazid, pirazinamid, streptomycin, ethambutol and ethionamid. Of 12 culture-positive samples, six were smear-negative and two MAC strains were recovered only after sample decontamination by SDS method. There were no differences between L-J medium and BI on recovery rates of the cultured materials.

KEYWORDS: Mycobacteria. Tuberculosis. AIDS.

REFERÊNCIAS

1. American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 156:S1-S25, 1997.
2. Arachi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*, 72:1-6, 1991.
3. Ausina V, Barrio J, Luquim M, Sambeat MA, Gurgui M, Verger G & Prats G. *Mycobacterium xenopi* infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 109:927-928, 1988.
4. Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S, Hartley C, O'Connell MA & Hopfer RL. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 34:2236-2239, 1996.
5. Barnes PF & Barrows SA. Tuberculosis in the 1990s. *Ann Intern Med* 119:400-410, 1993.
6. Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT. & Snider Jr DE. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 324:1644-1650, 1991.
7. Barret-Connor E. The epidemiology of tuberculosis in physicians. *JAMA* 241:33-38, 1979.
8. Barreto AMW, Martins FM, Campos CED, Gerhardt G, Asensi MD, Cunha EAT, Ferreira RMC, Guerra C, Jardim SBV, Matusiak R, Ramalhoto AM, Sewentes I, Silva AA, Souza MEM, Souza MJ & Vale SF. Frequência de doença pulmonar crônica nos casos de micobacterioses ocorridos no Brasil no período de 1989 a 1991. *J Pneumol* 18, supl.2:119, 1992.
9. Beck-Sagué C, Dooley SW, Hutton MD, Otten J, Breeden A, Crawford JT, Pitchenik AE, Woodley C, Cauthen G & Jarvis WR. Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected patients. *JAMA* 268:1280-1286, 1992.
10. Bethlem, N. El SIDA y la tuberculosis en Brasil. *Rev Argent del Torax* 50:19-27, 1989.

11. Bötger EC. *Mycobacterium genavense*: an emerging pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:932-936, 1994.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. 2 ed. Rio de Janeiro: MS 1994, 115p.
13. Busillo CP, Lessnau KD, Sajana V, Soumakis S, Davidson M, Mullen MP & Talavera W. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Chest* 102:797-801, 1992.
14. Butler WR, O'Connor SP, Yakrus MA, Smithwick RW, Plikaytis BB, Moss CW, Floyd M M, Woodley CL, Kilburn JO, Valdne FS & Gross WM. *Mycobacterium celatum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 43:539-548, 1993.
15. Canetti G, Rist N & Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev Tuberc Pneumol* 27:217-272, 1963.
16. Casabona NM, Rivera JO, Plá RV, Grau GC, Cayla JA & Fuente TG. Diagnosis of mycobacterial infection in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients and HIV carriers. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 36:293-302, 1992.
17. Castelo A. Acometimento pulmonar na síndrome da imunodeficiência adquirida. *J. Pneumologia* 13:22-34, 1987.
18. Centers for Disease Control and Prevention. 1993- Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for aids among adolescents and adults. *MMWR* 41:1-19, 1992.
19. Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM & Plikaytis BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 31:2049-2056, 1993.
20. Collins FM. *M. avium*-complex infections and development of the acquired immunodeficiency syndrome: casual opportunist or causal cofactor? *Int J Leprosy* 54:458-474, 1986.
21. Davidson PT & Le HQ. Drug treatment of tuberculosis. *Drugs* 43:651- 673, 1991.
22. Dooley SW, Villarino ME, Lawrence M, Salinas L, Amil S, Rullan JV, Jarvis WR, Bloch AB & Cauthen GM. Nosocomial transmission of tuberculosis in a Hospital Unit for HIV-infected patients. *JAMA* 267:2632-2634, 1992.
23. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM, Ong KR, Kilburn JO, Dooley SW, Castro KG, Jarvis WR & Holmberg SD. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 326:1514-1521, 1992.
24. Foley NM & Miller RF. Tuberculosis and aids, is the white plague up and coming? *J Infect* 26:39-43, 1993.
25. Forbes BA & Hicks KE. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:1688-1694, 1993.
26. Forbes BA & Hicks KES. Substances interfering with direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by PCR: effects of bovine serum albumin. *J Clin Microbiol* 34:2125-2128, 1996.
27. Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM & Dooley SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York city. *N Engl J Med* 328:521-526, 1993.
28. Garcia MLG, Gómez JLV, Sancho MCG, Álvares RAS, Zacarias F & Amor JS. Epidemiologia del SIDA y la tuberculosis. *Bol Oficina Sanit Panam* 116:546-565, 1994.
29. Gerhardt FG & Hijjar MA. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. *J Pneumol* 19:4-10, 1993.
30. Good RC & Snider DE. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States, 1980. *J Infect Dis* 146:829-833, 1982.
31. Grandes C, Lopez-de Munain J, Diaz T & Rullan JV. Drug-resistant tuberculosis in Puerto Rico, 1987-1990. *Am Rev Respir Dis* 148:6-9, 1993.

32. Grosset J. Current problems with tuberculosis treatment. *In: 13th Forum in Microbiology, Res Microbiol 147*: 10-16, 1996.
33. Hart CA, Beeching NJ & Duerden BI. Tuberculosis into the next century. *J Med Microbiol 44*:1-34, 1996.
34. Hawkins CC, Gold JWM, Whimbey E, Kiehn TE, Brannon P, Cammarata R, Brown AE & Armstrong D. *Mycobacterium avium*-complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med 105*:184-188, 1986.
35. Hoover DR, Graham NMH, Bacellar H, Murphy R, Visscher B, Anderson R & McArthur J. An epidemiologic analysis of *Mycobacterium avium* complex disease in homosexual men infected with human immunodeficiency virus type 1. *Clin Infect Dis 20*:1250-1258, 1995.
36. Horsburgh Jr CR & Selik RM. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (aids). *Am Rev Resp Dis 139*: 4-7, 1989.
37. Houston S & Fanning A. Current and potential treatment of tuberculosis. *Drugs 48*:689-708, 1994.
38. Huminer D, Dux S, Samra Z, Kaufman L, Lavy A, Block CS & Pitlik SD. *Mycobacterium simiae* infection in Israeli patients with AIDS. *Clin Infect Dis 17*:508-509, 1993.
39. Jemni L, Hmouda H & Letaief A. Disseminated infection due to *Mycobacterium malmoense* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis 19*: 203-204, 1994.
40. Kalayjian RC, Tossi Z, Tomaszefski JF, Carey JT, Ross JA, Tomford JW & Blinkhorn RJ. Pulmonary disease due to infection by *Mycobacterium avium* complex in patients with aids. *Clin Infect Dis 20*:1186-1194, 1995.
41. Kent JH. The epidemiology of multidrug resistant tuberculosis in the United States. *Med Clin North Am 77*:1391-1409, 1993.
42. Kiehn TE, Edwards FF, Brannon P, Tsang AY, Maio M, Gold JW, Whimbey E, Wong B, McClatchy JK & Armstrong D. Infections caused by *Mycobacterium avium*- complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility test, and morphological and serological characteristics. *J Clin Microbiol 21*:168-173, 1985.
43. Kiehn TE & White M. *Mycobacterium haemophilum*: an emerging pathogen. *Eur Clin Microbiol Infect Dis 13*: 925-931, 1994.
44. Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, van Heusden S, Kuijper S & Kolk AH. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol 32*: 672-678, 1994.
45. Lerner C W, Safdar A & Coppel S. *Mycobacterium haemophilum* infection in aids. *Infect Dis Clin Prac 4*: 233-236, 1995.
46. Long R, Scalcini M, Manfreda J, Carré J, Philippe E, Hershfield E, Sekla L & Stackiw W. Impact of human immunodeficiency virus type 1 on tuberculosis in rural Haiti. *Am Rev Respir Dis 143*: 69-73, 1991.
47. Miller B & Schieffelbein C. Tuberculosis. *WHO Bulletin, 76 (Supl 2)*: 141-143, 1998.
48. Morris SL & Rouse DA. The genetics of multiple drug resistance in *Mycobacterium avium* complex. *In 13th Forum in Microbiology, Res Microbiol 147*: 68-73, 1996.
49. Murray JF. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection during the 1990s. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis 66*: 21-25, 1991.
50. Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX & Wynne BA. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis 165*:1082-1085, 1992.
51. Nightingale SD, Cameron DW, Gordin FM, Sullam PM, Cohn DL, Chaisson RE, Eron L E, Sparti PD, Bihari B, Kaufman DL, Stern JJ, Pearce DD, Weinberg WG, LaMarca A & Siegal FP. Two controlled trials of rifabutin prophylaxis against *Mycobacterium avium* complex infections in aids. *N Engl J Med 329*: 828-833, 1993.
52. Nolte FS, Metchock B, McGowan JE, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, Mitchell PS, Plikaytis B & Shinnick T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol 31*: 1777-1782, 1993.
53. Noordhoek GT, van Embden JDA & Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol 34*: 2522-2525, 1996.
54. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons-Florida and New York, 1988-1991. *MMWR, 40*: 585-591, 1991.
55. O'Brien RJ, Geiter LJ & Snider DE. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States: results from a national survey. *Am Rev Resp Dis 135*: 1007-1014, 1987.
56. Pinto WP, Cavallari MM, Gejer M, Medeiros LA, Prado KD, Rego FM, Souza RA & Castilho EA. Manifestações clínicas da aids em 163 pacientes ambulatoriais. *Rev Soc Bras Med Trop 24 (Supl. 2)*: 54, 1991.
57. Pinto WP, Hadad DJ, Palhares MCA, Ferrazoli L, Telles MAS, Ueki SYM, Santos MTF, Placco ALN, Sauaia N & Palaci M. Drug resistance of *M. tuberculosis* isolated from patients with HIV infection seen at an aids reference center in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop 38*: 15-22, 1996.
58. Pitchenik AE, Cole C, Russel BW, Fischl MA, Spira TJ & Snider DE. Tuberculosis, atypical mycobacteriosis, and the acquired immunodeficiency syndrome among haitian and non-haitian patients in south Florida. *Ann Intern Med 101*: 641-645, 1984.
59. Pitchenik AE & Rubinson HA. The radiographic appearance of tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (aids) and pre aids. *Am Rev Resp Dis 131*: 393-396, 1985.
60. Rastogi N & Falkinham IJO. Solving the dilemma of an antimycobacterial chemotherapy. *In: 13th Forum in Microbiology, Res Microbiol 147*: 7-10, 1996.
61. Ries KM, White Jr GL & Murdock RT. Atypical mycobacterial infection caused by *Mycobacterium marinum*. *N Engl J Med 322*: 633, 1990.
62. Rodrigues-Barradas MC, Clarridge J & Darouiche R. Disseminated *Mycobacterium fortuitum* disease in an aids patient. *Am J Med 93*: 473-474, 1992.
63. Sathe SS & Reichman LB. Mycobacterial disease in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Chest Med 10*: 445-467, 1989.
64. Scalcini M, Carre G, Jean-Baptiste M, Hershfield E, Parker S, Wolfe J, Nelz K & Long R. Antituberculous drug resistance in central Haiti. *Am Rev Resp Dis 142*: 508-511, 1990.
65. Segal-Maurer S & Kalkut GE. Environmental control of tuberculosis: continuing controversy. *Clin Infect Dis 19*: 299-308, 1994.
66. Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE & Armstrong D. Tuberculosis in the aids era. *Clin Microbiol Rev 8*: 180-199, 1995.
67. Sherer R, Sable R, Sonnenberg M, Cooper S, Spencer P, Schwimmer S, Kocka F, Muthuswamy P & Kallick C. Disseminated infection with *Mycobacterium kansasii* in the acquire immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med 105*: 710-712, 1986.
68. Silva EAM, Sato DN, Telles MAS, Martins MC, Palaci M & Ueki SYM. Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo, 1986 a 1990. *Rev Inst Adolfo Lutz 52*: 37-49, 1992.
69. Soini H, Skumik M, Lippo K, Tala E & Viljanen MK. Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. *J Clin Microbiol 30*: 2025-2028, 1992.
70. Springer B, Tortoli E, Richter I, Grünwald R, Rüsck-Gerdes S, Uschmann K, Suter F, Collins MD, Kroppenstedt RM & Böttger EC. *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections. *J Clin Microbiol 33*: 2805-2811, 1995.
71. Styblo K. Aspectos sobre la tuberculosis y la infección VIH a nivel mundial. *Bol U Int Tub Enf Respir 65*: 17-35, 1990.

72. Tortoli E, Cichero P, Chirillo MG, Gismondo MR, Bono L, Gesu G, Simonetti MT, Volpe G, Nardi G & Marone P. Multicenter comparison of ESP culture system II with BACTEC 460TB and with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens, including blood. *J Clin Microbiol* 36: 1378-1381,1998.
73. Tsukamura M. *Identification of mycobacteria*. The National Chubu Hospital, Oby Aichi, Japan, 1984. 90 p.
74. Tuberculosis and aids; statement on aids and tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc. Lung Dis* 64: 8-11, 1989.
75. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. Recommendations of the Advisory Committee for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR*, 38: 236-238,1989.
76. Vitti W & Kritski AL. Retrospective study of short-course anti-TB therapy in HIV infected IVDU, Santos, Brazil. In: *International Conference on AIDS*, 8. Amsterdam, 1992. Abstract. p.145.
77. Wilson ML, Stone BL, Hildred MV & Reves RR. Comparison of recovery rates for mycobacteria from BACTEC 12B vials, Middlebrook 7H11- selective 7H11 biplates, and Löwenstein-Jensen slants in a public health mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 33: 2516-2518, 1995.
78. Wolinsky E. State of the art: nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev Respir Dis* 119: 107-159, 1979.
79. Yew WW, Piddock LJV, Li MSK, Lyon D, Chan CY & Cheng AFB. In-vitro activity of quinolones and macrolides against mycobacteria. *J Antimicrob Chemoth* 34: 343-351,1994.
80. Young LS, Inderlied CB, Berlin OG & Gottlieb M.S. Mycobacterial infections in aids patients, with an emphasis on the *M. avium* complex. *Rev Infect Dis* 8: 1024-1033, 1986.