

## VALOR DA CULTURA NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOBACTERIOSES: ESTUDO DE 22 CASOS\*

MARIA DO CARMO BRAGA ALVARIZA\*\*

MARIA MARTA SANTOS BOFFO\*\*

MARIA NOEL GIOIA BORCA DE COCH\*\*

JUSSARA MARIA SILVEIRA\*\*\*

TANIA MARIA MORAIS TEIXEIRA\*\*\*\*

LUÍS FERNANDO CIELO\*\*\*\*

### RESUMO

No presente estudo foi avaliado o valor da cultura para diagnóstico laboratorial de micobacterioses em 22 pacientes. Destes, pelo menos um dos espécimes colhidos não apresentou bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) na baciloscopia (BCP), mas a cultura nos meios de Löwenstein-Jensen & Stonebrink evidenciou crescimento de microorganismos com essas características morfo-tintórias. Considerando todos os exames realizados para pesquisa de micobactérias em cada paciente, observou-se que a cultura foi o único método laboratorial a diagnosticar: (a) tuberculose pulmonar em 8 casos, pulmonar e extrapulmonar em 2 casos e somente extrapulmonar em um caso; (b) dois casos de micobacteriose pulmonar e um de extrapulmonar, sem confirmação da espécie, porque, apesar do crescimento de BAAR, estes não permaneceram viáveis até o processo de identificação, e (c) micobacteriose pulmonar por *Mycobacterium avium* em um caso. O resultado da cultura antecedeu ao da BCP em 2 dos casos, enquanto que apenas em 4 casos foram obtidos outros espécimes positivos à BCP no mesmo período, e num destes a cultura permitiu a confirmação de uma BCP com escassos BAAR. Um microorganismo álcool-ácido resistente com características sugestivas de pertencer ao gênero *Nocardia* foi enviado a laboratório de referência para identificação.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, micobactérias, tuberculose, micobacteriose.

---

\* Trabalho desenvolvido no Setor de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Patologia da Universidade do Rio Grande, com auxílio financeiro da FURG e FAPERGS.

\*\* Professora do Departamento de Patologia - URG.

\*\*\* Professora do Departamento de Medicina Interna - URG.

\*\*\*\* Acadêmico de Medicina e Bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

## ABSTRACT

The definitive diagnosis of tuberculosis requires the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens. However, in developing countries the diagnosis of tuberculosis usually means recognition of acid-fast-staining bacilli by microscopy. We prospectively studied the microbiological findings of 22 patients in order to evaluate the role of culture in micobacterial infection diagnosis. At least one clinical specimen of all these patients revealed smear negative and presence of acid-fast bacilli in the culture. Only culture established the diagnosis of pulmonary tuberculosis in 8 patients, pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in 2 patients, only extrapulmonary tuberculosis in one patient and pulmonary infection caused by *Mycobacterium avium* in another one. Two cases of pulmonary mycobacteriosis and one of extrapulmonary tuberculosis were detected by culture, but the isolates were not viable at the identification procedures. Six patients had positive culture and sputum smear but two of them obtained the culture results before developing a smear positive status. One acid-fast microorganism with suggestive characteristics of *Nocardia* was sent to a reference laboratory for identification procedures.

## 1 - INTRODUÇÃO

A tuberculose continua sendo um importante problema de saúde, especialmente nos países em desenvolvimento. Estima-se que a cada ano desenvolvem-se aproximadamente 3 a 4 milhões de casos pulmonares positivos à baciloscopia e outros 3 a 4 milhões de casos negativos à baciloscopia ou extrapulmonares. Cerca de 2 a 3 milhões de pessoas morrem de tuberculose a cada ano<sup>16</sup>.

A Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária do Ministério da Saúde considera como caso positivo de tuberculose pulmonar, para fins epidemiológicos, aquele confirmado pela baciloscopia direta do escarro<sup>7</sup>. Essa definição leva em conta o fato de que a baciloscopia é considerada o exame básico para o diagnóstico de tuberculose humana, principalmente na sua forma broncopulmonar, devido à execução rápida, sensível e econômica, que permite uma ampla cobertura de diagnóstico, especialmente em regiões de escassos recursos.<sup>9</sup>

Entretanto, o diagnóstico definitivo de tuberculose requer o isolamento do *Mycobacterium tuberculosis* a partir de material clínico do paciente, pois uma baciloscopia com presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) é somente um diagnóstico presuntivo, uma vez que as espécies de micobactérias não podem ser determinadas a partir do esfregaço<sup>6,15</sup>. Além disso, outras espécies bacterianas, especialmente do gênero *Nocardia*, apresentam ácido-resistência em forma variável<sup>6,12</sup>.

O cultivo é reconhecido como método mais sensível, indicado

especialmente para o diagnóstico de casos de tuberculose paucibacilares, como as formas pulmonares com baciloscopia negativa, as extrapulmonares, a tuberculose infantil, na tuberculose em pacientes portadores de enfermidades imuno-supressoras - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, linfomas, leucemia, e também no acompanhamento da eficácia terapêutica.<sup>2,8,10,11</sup>

O presente trabalho revisa os casos de micobacterioses identificados laboratorialmente no Setor de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Patologia - URG, nos quais foram observados resultados negativos na baciloscopia e positivos no exame cultural, com o objetivo de determinar o valor da cultura no processo diagnóstico.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Material clínico**

No período de setembro de 1990 a dezembro de 1992, foram encaminhados ao Setor de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Patologia da Universidade do Rio Grande 788 espécimes clínicos - 646 casos de origem pulmonar e 142 de origem extrapulmonar, provenientes de 313 pacientes atendidos no Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr. e de 23 pacientes encaminhados ao Centro de Saúde da Cidade do Rio Grande para pesquisa de micobactérias.

### **2.2 - Pesquisa de micobactérias**

Dos espécimes recebidos, 308 foram submetidos somente ao exame baciloscópico, 475 à baciloscopia e cultura e 5 somente à cultura.

A baciloscopia (BCP) - realizada em esfregaço corado pelo método de Ziehl-Neelsen - e a informação dos resultados seguiu recomendações da Organização Pan-Americana de Saúde<sup>9</sup>. No caso de baciloscopias de escarro, sempre que houve ausência ou menos que 10 BAAR nos primeiros 100 campos, o número de campos microscópicos lidos foi de 300.

A cultura foi realizada em meios de Löwenstein-Jensen & Stonebrink, com descontaminação prévia dos espécimes clínicos potencialmente contaminados, pelo métodos de Petroff.<sup>9</sup>

Na presença de crescimento bacteriano foi realizada a pesquisa de BAAR, sendo as amostras com resultado positivo submetidas às provas de produção de Niacina, inibição da catalase a 68 °C e produção de nitrato<sup>4</sup>. As amostras que, de acordo com esses testes, não pertenciam à espécie *M. tuberculosis*, foram encaminhadas ao Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, para identificação.

TABELA 1 - Casos de infecção por *M. tuberculosis* com pelo menos um dos espécimes negativo à BCP e positivo na cultura.

Número do caso	Espécime	Observações sobre outros espécimes colhidos do mesmo paciente
1	pulmonar	Apresentou BCP+ em outro espécime pulmonar coletado no mesmo período.
4	pulmonar	
5	pulmonar	segundo espécime coletado após 65 dias mostrou BCP+.
6	pulmonar	
8	pulmonar	Após um mês apresentou espécime hepático com BCP e cultura +.
10	pulmonar	Após um mês apresentou espécime ganglionar com BCP e cultura +.
11	pulmonar	Mais 2 espécimes foram examinados. Um destes mostrou BCP com 6 BAAR observados em 300 campos.
12	pulmonar	Segundo espécime após 48 dias mostrou BCP+.
13	hepático	Apresentou, em líquido, BCP não-conclusiva e cultura +; em espécime pulmonar, BCP+ e cultura contaminada por outros microorganismos.
14	pulmonar	
15	pulmonar	Apresentou BCP+ em outro espécime pulmonar coletado no mesmo período.
16	pulmonar	Apresentou BCP+ em outro espécime pulmonar coletado no mesmo período.
17	pulmonar	
18	pulmonar ganglionar	
20	pulmonar	Apresentou espécime hepático e ganglionar com BCP e cultura +.
21	pulmonar hepático	Apresentou um espécime ganglionar com BCP e cultura +.
22	pulmonar	

BCP = baciloscopia

BCP+ ou cultura + = presença de BAAR na baciloscopia ou cultura.

### 2.3 - Seleção dos pacientes

Foram selecionados para este estudo 22 pacientes que apresentaram pelo menos um espécime clínico cuja baciloscopia foi negativa mas originou crescimento de bactérias álcool-ácido resistentes na cultura. Para fim de descrição dos casos, os pacientes foram rotulados com números.

### 3 - RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os casos de tuberculose devidamente comprovados pelo isolamento e identificação do *M. tuberculosis*, nos quais pelo menos um dos espécimes teve resultado negativo na BCP e positivo na cultura. No caso n.º 11, a BCP do 3.º espécime colhido evidenciou a presença de apenas 6 BAAR em 300 campos examinados, sendo o primeiro BAAR observado após o centésimo campo.

O cultivo dos espécimes de origem pulmonar, nos casos n.º 2 e n.º 19, e de origem hepática, no caso n.º 7, após 20 dias, apresentou crescimento de colônias não-pigmentadas formadas de BAAR. Estes, entretanto, não permaneceram viáveis até que o processo de identificação fosse completado.

No caso n.º 9, o espécime proveniente de empiema pulmonar originou o crescimento de um microorganismo com morfologia colonial e celular sugestiva do gênero *Nocardia*. Aguardamos identificação da amostra por laboratório de referência.

No caso n.º 3 houve quatro isolamentos de *M. avium* sucessivos, no período de um ano. Somente o primeiro foi acompanhado de baciloscopia positiva. O laboratório recebeu a informação de que o paciente teve, repetidamente, repetidamente, resultados negativos para pesquisa de anticorpos anti-HIV no soro.

### 4 - DISCUSSÃO

As micobactérias são bacilos retos ou levemente encurvados, aeróbicos, imóveis e não-formadores de esporos. Possuem paredes celulares ricas em conteúdo lipídico, o qual é responsável por sua habilidade de resistir à coloração por corantes usuais derivados da anilina e tornando colorações como a de Gram relativamente ineficazes. Mas quando são utilizados métodos que promovem a captação dos corantes, as micobactérias não são facilmente descoradas, mesmo com álcool-ácido. Por isso são descritas como ácido resistentes<sup>14</sup> ou álcool-ácido resistentes.<sup>4,9</sup> Essa característica torna o

exame direto do material clínico um valioso procedimento diagnóstico, sendo especialmente útil em países em desenvolvimento, que têm alta prevalência de infecções micobacterianas e onde o sistema de cultura não é facilmente disponível.<sup>3</sup>

Entretanto, Kim et al.<sup>11</sup> descrevem que, quando há suspeita de tuberculose pulmonar, os médicos devem esperar resultados negativos entre 60 e 80% dos pacientes com doença não-cavitária moderadamente avançada; 30 a 40% dos pacientes com doença mais extensa e mesmo 5 a 10% dos pacientes com tuberculose cavitária bastante avançada. Isso ocorre porque a positividade na baciloscopia está diretamente relacionada com a concentração bacilar. Assim, a probabilidade de um resultado positivo num indivíduo que excreta entre 5.000 e 10.000 bacilos/ml de escarro é somente de 50 a 58%. Já a cultura poderá proporcionar o desenvolvimento de uma colônia no meio se a amostra contiver 10 bacilos viáveis/ml.<sup>4</sup>

Em nosso estudo foram encontrados 10 casos, identificados pelos números 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18, 21 e 22, cujos diagnósticos laboratoriais de tuberculose pulmonar foram obtidos somente pela cultura, sugerindo estarem enquadrados em uma das situações descritas acima. No caso n.º 11, a cultura foi útil para elucidar a baciloscopia que apresentou somente 6 BAAR em 300 campos. Esse número está muito próximo dos recomendados por Kantor<sup>9</sup> e David et al.<sup>4</sup> para considerar um resultado duvidoso.

Nos casos números 1, 15 e 16, a cultura contribuiu apenas para a identificação do agente como *M. tuberculosis*, uma vez que outros espécimes colhidos no mesmo período apresentaram BCP positiva.

Os casos números 13, 18 e 21 evidenciam o valor do cultivo no diagnóstico de tuberculose extrapulmonar. De acordo com recomendações elaboradas pela Organização Mundial da Saúde<sup>9</sup>, na suspeita de uma micobacteriose, todos os espécimes extrapulmonares devem ser submetidos à cultura.

Na vigência de uma BCP negativa, o crescimento de BAAR em cultura, mesmo não identificado, como nos casos números 2, 7 e 19, tem comprovada importância diagnóstica porque, para fins de terapia, qualquer organismo álcool-ácido resistente isolado deve ser considerado como *M. tuberculosis* até que se prove o contrário.<sup>8</sup>

Na ausência da inclusão de registros clínicos neste estudo, não foi determinada a razão pela qual a baciloscopia dos casos n.º 5 e n.º 12 tornou-se positiva após 65 e 48 dias, respectivamente, da coleta do primeiro espécime, positivo somente na cultura. A cultura, nesses casos, foi um diagnóstico precoce, mesmo considerando a demora de 3 a 6 semanas para detecção do crescimento do *M. tuberculosis* no meio de Löwenstein-Jensen.<sup>6</sup>

Apesar de *M. tuberculosis* ser a micobactéria mais prevalente não só no nosso estudo como em casos relatados na literatura<sup>1,5,6,16</sup>, vários

autores descrevem o isolamento de micobactérias outras que não a da tuberculose<sup>2,5,14</sup>. As culturas realizadas no caso n.º 3 mostraram por quatro vezes o isolamento repetido de *M. avium*, no período de um ano. Essa é uma das micobactérias mais freqüentemente isoladas de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, mas também relatada em pacientes não-portadores do HIV, como o do presente estudo.<sup>2,5</sup>

No caso n.º 9, a cultura contribuiu para exclusão do diagnóstico de micobacteriose. O aparecimento de outros gêneros bacterianos como *Rhodococcus* e *Nocardia*, que apresentam características de álcool-ácido resistência, tem sido relatado como causa de infecção, e estes só poderão ser identificados após o cultivo dos espécimes.<sup>12,13</sup>

De acordo com os resultados obtidos neste estudo e relatos da literatura, apesar de a cultura de micobactérias exigir mais tempo, material e pessoal especializado, concluímos que sua realização é importante no diagnóstico da tuberculose, de outras micobacterioses e de infecções causadas por microorganismos que compartilhem a característica de álcool-ácido resistência. Esforços devem ser dirigidos no sentido de sua implantação em laboratórios que recebem solicitações para pesquisa de micobactérias em materiais clínicos diversos, especialmente de serviços que atendem pacientes portadores de SIDA, nos quais são mais freqüentes as formas de tuberculose extrapulmonares e outras micobacterioses.<sup>8,10</sup>

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pesquisadores Moisés Palaci, Luci Ferrazoli, Maria Alice Silva Teles, Maria Conceição Martins e Suely Ueki, do Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, pelo incentivo e orientação recebidos, além da identificação de amostras bacterianas; à Chefe do Laboratório de Análises Clínicas da FURG, bioquímica Maria Cristina Borralho, pela cedência de material clínico; à técnica de laboratório Maricler Lopes de Ávila e à auxiliar Sandra Mara Valerão Alves, pela colaboração prestada no decorrer do trabalho.

#### BIBLIOGRAFIA

1. CHAISSON, R. E.; SCHECTER, G. F.; THEUER, C. P.; RUTHERFORD, G. W.; ECHENBERG, D. F.; HOPEWELL, P. C. Tuberculosis in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136: 570-574, 1987.
2. CONTRERAS, M. A.; CHEUNG, O. T.; SANDERS, D. E.; GOLDSTEIN, R. S. Pulmonary Infection with Nontuberculous Mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 137: 149-152, 1988.
3. DANIEL, T. M. Rapid diagnosis of tuberculosis laboratory techniques applicable in developing countries. *Rev. Infect. Dis.*, 11 (Suppl.): S471-S478, 1989.
4. DAVID, H.; LEVY-FREBAULT, V.; THOREL, M. F. *Méthodes de Laboratoire pour Mycobactériologie Clinique*. Paris: Institut Pasteur, 1989. 85 p.
5. DEBRUNNER, M.; SALFINGER, M.; BRÄNDLI, O.; GRAEVENITZ, A. Epidemiology and Clinical Significance of Nontuberculous Mycobacteria in Patients Negative for Human Immunodeficiency Virus in Switzerland. *CID*, 15: 330-345, 1992.

6. DEZPREZ, R. M.; HEIN, C. R. *Mycobacterium tuberculosis*. In: MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G.; BENNETT, J. E. *Enfermedades Infecciosas*. 3. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1991. p. 1986-2017.
7. DIVISÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Normas para o Controle da Tuberculose*. 3. ed. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1988, 36 p.
8. HOPEWELL, P. C. Impact of Human Immunodeficiency Virus Infection on the Epidemiology, Clinical Features, Management, and Control of Tuberculosis. *CID*, 15: 540-547, 1992.
9. KANTOR, I. N. *Bacteriología de la Tuberculosis*. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis, 1979. 63 p.
10. KLEIN, N. C.; DUNCANSON, F. P.; LENOX III, T. H.; PITTA, A.; CHOEN, S. C.; WORMSER, G. P. Use of Mycobacterial Smears in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in AIDS/ARC Patients. *Chest*, 95: 1190-1192, 1989.
11. KIM, T. C.; BLACKMAN, R. S.; HEATWOLE, K. M.; KIM, T.; ROCHESTER, D. F. Acid-Fast Bacilli in Sputum Smears of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129: 264-268, 1984.
12. LERNER, P. I. Especies de Nocardia. In: MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G.; BENNETT, J. E. *Enfermedades Infecciosas*. 3. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1991. p. 2039-2045.
13. MACGREGOR, J. H.; SAMUELSON, W. M.; SANE, D. C.; GODWIN, J. D. Opportunistic Lung Infection Caused by *Rhodococcus equi*. *Radiology*, 160: 83-84, 1986.
14. ROBERTS, G. D.; KONEMAN, E. W.; KIM, Y. K. *Mycobacterium*. In: BALLOWS, A.; HAULSER JR., W. J.; HERRMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHADOMY, H. J. *Manual of Clinical Microbiology*. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p. 304-339.
15. SOMMERS, H. M. & McCLATCHY, J. K. *Cumitech 16, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses*. Washington: American Society for Microbiology, 1983. 18 p.
16. STYBLO, K. Overview and Epidemiological assessment of the Current Global Tuberculosis situation with an emphasis on Control in Developing Countries. *Rev. Infect. Dis.*, 11 (Suppl.): S339-S346, 1989.