

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Mycobacterium tuberculosis:

PREVALÊNCIA DE CEPAS RESISTENTES EM INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS

MARILEI WOLFART

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, 2003

WOLFART, Marilei

Mycobacterium tuberculosis: prevalência de cepas resistentes em indivíduos HIV-positivos. /

Marilei Wolfart/ - Porto Alegre, 2003.

xi, 76f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina.
Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Título em Inglês: *Mycobacterium tuberculosis*: prevalence of resistant isolates in HIV-positive patients in a tertiary hospital in southern Brazil.

1. *Mycobacterium tuberculosis*
2. tuberculose multirresistente
3. MDR-TB
4. Perfil de sensibilidade aos tuberculostáticos

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Afonso Luís Barth pela sua mestria em todas as etapas deste estudo, por todas as oportunidades que me confiou, por todos os seus ensinamentos e por ser um exemplo de Mestre.

Aos meus colegas e amigos da Unidade de Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, agradeço por todas as colaborações que tive para realizar o meu mestrado. À farmacêutica-bioquímica Susana Barcellos, chefe da Unidade de Microbiologia, agradeço por ter acreditado e investido no meu crescimento profissional. Um agradecimento especial à farmacêutica-bioquímica Denise Willers pela parceria na execução da coleta de dados deste estudo.

Às bolsistas da Unidade de Microbiologia, Raquel Canabarro, Patrícia Pezzi, Valéria Weiss e Katia Pilger, que trabalharam junto no desenvolvimento da área de diagnóstico laboratorial de micobacterioses.

À secretária do Curso de Especialização em Análises Clínicas, Jaqueline Nilson, pela sua presteza e eficiência.

Ao chefes do Serviço de Patologia Clínica, Prof. Dr. Rogério Friedman e Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier, ao farmacêutico-bioquímico Jorge Luís Bajerski, administrador do Serviço, agradeço pelo apoio e incentivo recebido.

Aos professores do Serviço de Pneumologia pelos incentivos, confiança e por todas as oportunidades que me foram oferecidas. Em

especial a Profa. Dra. Lucélia Henn, com quem tive o privilégio de um convívio maior.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do nosso Hospital pelas importantes contribuições nas análises estatísticas deste estudo.

Ao Programa Estadual de Controle da Tuberculose, e em especial às farmacêuticas-bioquímicas do Laboratório da Tuberculose do LACEN (Laboratório Central do Rio Grande do Sul), pelo fornecimento de dados estatísticos que viabilizaram importantes etapas deste estudo.

A meus pais, a quem devo a sintonia transparente entre o meu ser consciente e o meu ser inconsciente, agradeço pela intensidade dos sentimentos e ensinamentos que recebi, por tudo que fizeram e por tantas outras que deixaram de fazer para que eu chegasse até aqui. Embora, por vontade divina, não os tenho mais, agradeço todos os dias pelo tempo que me foi permitido tê-los.

E, de forma muito especial, ao Hélio, meu amigo, companheiro e meu grande amor, agradeço pelos ensinamentos dos recursos de informática e pelas intervenções tão oportunas naqueles momentos em que a vontade era de jogar tudo para o alto e gritar: "Para mundo que eu quero descer!"

Enfim, dedico este trabalho a minha filha Isadora, que sequer existia no início deste estudo e hoje é a principal fonte do meu viver.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	05
1- INTRODUÇÃO	06
2- REVISÃO DA LITERATURA	
2.1- Generalidades	08
2.2- Mecanismos e Fatores associados à resistência do <i>M.tuberculosis</i>	11
2.3- A Tuberculose no Brasil	16
2.4- Diagnóstico laboratorial da tuberculose	17
2.5- Sistema radiométrico	18
2.6- Teste de Suscetibilidade aos Tuberculostáticos	19
3- OBJETIVOS	
3.1- Objetivo Geral	21
3.2 - Objetivo Específico	21
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
5- ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS	31
6- ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS	53
7- ANEXO 1	77
Aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós Graduação.	
Aprovação de Recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.	
8- ANEXO 2	80
Resumo do Pôster apresentado na sessão de pôster do "4 th International Conference of the Hospital Infection Society", Edimburgo (Escócia), 1998.	

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR - Bacilo Álcool-Ácido Resistente

DNT - Divisão Nacional de Tuberculose

E - Etambutol

H - Isoniazida

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IC95% - Intervalo de Confiança de 95%

MDR-TB - Tuberculose Multirresistente (Resistência a, no mínimo, Isoniazida e Rifampicina)

MOTT - Micobactérias não tuberculose

MT/HIV - *Mycobacterium tuberculosis* e Vírus da Imunodeficiência Humana

NAP - p-nitro- α -amino- β -hidroxipropiofenona

NT - Pacientes sem histórico de Tratamento com Tuberculostáticos

PCT/RS - Programa de Controle da Tuberculose do Rio Grande do Sul

PZA - Pirazinamida

R - Rifampicina

S - Estreptomicina

T - Pacientes Tratados com Tuberculostáticos

TB - Tuberculose

WHO/IUATLD - World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), infecção causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MT), é uma doença de alta prevalência no Brasil, principalmente em áreas urbanas. As taxas de incidência da doença variam de 34/100.000 habitantes, no sul do país, até 120/100.000 no Rio de Janeiro (1).

O curso da doença tuberculose permaneceu essencialmente inalterado por muitos anos. No entanto, nas últimas décadas, a infecção causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) transformou o panorama endêmico da TB em uma epidemia mundial. Estima-se que haja, no Brasil, cerca de 150.000 pessoas co-infectadas com o *M. tuberculosis* e o HIV (MT/HIV).

Nos últimos anos, a emergência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos tuberculostáticos de primeira linha, em especial à isoniazida e à rifampicina, relatada em pacientes HIV-positivos nos Estados Unidos (EUA) e na Inglaterra, mudou, drasticamente, o aspecto epidemiológico da TB, apontando para o surgimento de uma nova epidemia: a tuberculose multirresistente (MDR-TB).

A TB resistente aos fármacos de primeira linha tem sido uma ameaça para os programas de controle da doença em todo o mundo. Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) realizou um inquérito global para medir a real magnitude desse problema. Esse estudo encontrou resistência do bacilo da TB em todos os países inspecionados e MDR-TB nos cinco continentes. Um terço dos países inspecionados apresentaram prevalência de MDR-TB superiores a 2% em indivíduos sem tratamento prévio para a doença. Outros importantes achados desse estudo foram os altos níveis de MDR-TB em países, considerados pela OMS, com programas de controle da tuberculose deficitários e baixos índices em países com alta taxa de co-infecção TB/HIV (62).

O Brasil participou do inquérito realizado pela OMS e a prevalência de MDR-TB em pacientes sem tratamento prévio com tuberculostáticos foi de 0,9%. O estudo, porém, não avaliou a resistência do bacilo da TB em indivíduos infectados pelo HIV. Outros estudos realizados no Brasil mostraram resultados conflitantes e também não avaliaram a resistência do MT em pacientes infectados como o HIV (57,58, 59,60,61).

O presente estudo se propõe a determinar a prevalência de *M. tuberculosis* resistente aos cinco tuberculostáticos de primeira linha em pacientes HIV-positivos tratados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, considerado referência regional e nacional em SIDA, entre outras áreas. A instituição atende de maneira universal e gratuita e é procurada, principalmente, pela população de Porto Alegre e Grande Porto Alegre. O HCPA realiza uma média de setecentas internações/ano para o tratamento da SIDA.

A motivação do estudo foi fundamentada na hipótese de que a prevalência de MDR-TB em tuberculosos infectados com HIV fosse diferente da encontrada na população tuberculosa, em geral, do Rio Grande do Sul.

A justificativa para a realização deste trabalho consiste na ausência de dados na literatura sobre a prevalência de MDR-TB em tuberculosos infectados com HIV na população local.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Generalidades

O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da TB, a mais antiga doença infecciosa documentada. Kapur e colaboradores (2), valendo-se de técnicas moleculares, encontraram o *M. tuberculosis* em artefatos arqueológicos com 15.000 anos de existência e evidências da doença em humanos há, pelo menos, 5.000 anos.

A tuberculose tem sido associada à pobreza, falta de saneamento básico, altos índices demográficos, desnutrição, uso de drogas imunossupressivas e outras doenças de base, como: diabete *mellitus*, insuficiência renal crônica e mais notavelmente, a infecção pelo HIV (3).

A TB é uma doença infecto-contagiosa de alta morbidade, transmitida pessoa a pessoa por via aerógena, através da eliminação de aerossóis contaminados com o bacilo da tuberculose originados durante a tosse, a expectoração e a fala dos indivíduos doentes. Esses aerossóis, contendo em torno de um a dez bacilos, permanecem em suspensão no ar e, quando inalados, podem infectar o trato respiratório inferior (4). A progressão para a doença depende, principalmente, da resposta imunológica do hospedeiro, especialmente das células imuno-mediadoras na presença do *M. tuberculosis* (5). Possivelmente 10% dos indivíduos infectados, apresentarão a doença na forma clínica. Os outros 90% apresentarão a infecção tuberculosa, detectada somente pela reação positiva no teste tuberculínico.

A incidência da TB, segundo a OMS, é estimada em oito milhões de novos casos por ano embora somente três milhões sejam notificados (6,7). Previsões globais indicavam um importante incremento no percentual de tuberculose atribuído a infecções

pelo HIV na década de 90 (8,9,10,11) (tabela 1). Contudo, foi nos países com orçamentos notoriamente insuficientes para a saúde pública e onde os investimentos em pesquisa e na indústria farmacêutica eram inexistentes que concentraram-se a grande maioria de indivíduos tuberculosos (12) (Figura 1).

Tabela 1. Estimativa, por região, da incidência de TB e de casos de TB atribuídos à co-infecção *M. tuberculosis* e HIV (MT/HIV) na década de 90.

Regiões	1990			1995			2000		
	TB total	Taxa ^a	MT/HIV	TB total	Taxa	MT/HIV	TB total	Taxa	MT/HIV
Sudeste Asiático	3 106.000	237	66.000	3 499.000	241	251.000	3 952.000	247	571.000
Oeste do Pacífico ^b	1 839.000	136	19.000	2 045.000	140	31.000	2 255.000	144	68.000
África	992.000	191	194.000	1 467.000	242	380.000	2 079.000	293	604.000
Leste do Mediterrâneo	641.000	165	9000	745.000	168	16.000	870.000	168	38.000
Américas ^c	569.000	127	20.000	606.000	123	45.000	645.000	120	97.000
Leste Europeu	194.000	47	1.000	202.000	47	2.000	210.000	48	6.000
Países Industrializados ^d	196.000	23	6.000	204.000	23	13.000	211.000	24	26.000
Total	7537.000	143	315.000 (4,2%)	8768.000	152	738.000 (8,4%)	10 222.000	163	1 410.000 (13,8%)

^a Taxa de incidência por 100.000 habitantes

^b Inclui todos os países da OMS do oeste do Pacífico, exceto Japão, Austrália e Nova Zelândia

^c Inclui todos os países da OMS das Américas, exceto USA e Canadá

^d Países do oeste europeu, USA, Canadá, Japão, Austrália e Nova Zelândia

Dados reproduzidos a partir das referências 10 e 11.

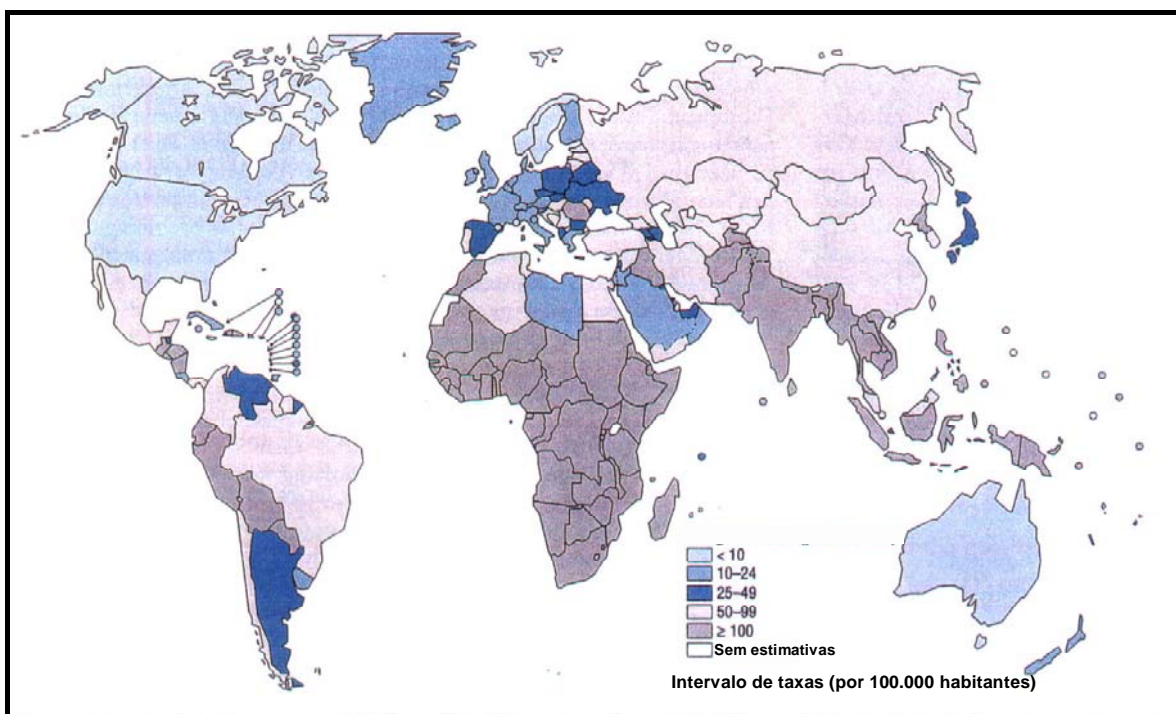


Figura 1: Incidência da tuberculose em 1996, conforme a OMS_Global Tuberculosis Control, WHO Report 1998, Geneva (12).

No Brasil, a tuberculose persiste como um importante problema de saúde pública. Em 1995 foram notificados 90.665 casos novos, com um coeficiente de incidência de 54,46/100.000 habitantes (13). Os estudos epidemiológicos da TB no Brasil, na última década, apontam para perspectivas de aumento nos números de casos em decorrência da deficiência dos serviços de saúde, piora das condições econômicas de boa parte da população e aumento da incidência de indivíduos HIV-positivos (14).

A TB tem sido freqüentemente relacionada com o aumento da morbidade e hospitalizações de pacientes com SIDA (15). A co-infecção com TB pode estar presente em indivíduos HIV-positivos assintomáticos para a doença SIDA e com contagens de linfócitos CD4 acima de 100 células/ μ l, o que poderia ser justificado pelo fato que as citocinas envolvidas na defesa imunológica contra a TB podem ser deletérias para o paciente HIV-positivo, acelerando o processo da doença (16). Zhang e colaboradores

(17) demonstraram que tanto o *M. tuberculosis* quanto o seu maior componente de parede celular (lipoarabinomanan) são potentes indutores de replicação *in vitro* do HIV-1. Em contrapartida, a progressiva redução e disfunção da resposta imunológica em pacientes HIV-positivos aumenta o risco tanto de reativação da TB latente quanto o de nova infecção.

Um outro agravante da epidemiologia da TB tem sido a emergência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos tuberculostáticos de primeira escolha: Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Estreptomicina e Pirazinamida. Em especial, a resistência aos dois fármacos mais ativos, isoniazida e rifampicina (18,19).

Assim, a resistência aos fármacos de primeira escolha tem se mostrado uma importante ameaça para o controle da doença pois apenas estas cinco substâncias são reconhecidas como efetivas contra a tuberculose. O tratamento da TB fazendo uso de outros fármacos (referidos como de segunda e terceira linha) é mais susceptível a falhas, apresentam alto custo e elevada toxicidade.

2.2. Mecanismos e fatores associados à resistência do *M. tuberculosis*

A resistência do *M. tuberculosis* aos tuberculostáticos é resultante da amplificação do processo natural de mutações espontâneas.

Assim, a resistência do bacilo da TB para os tuberculostáticos ocorre mesmo antes da utilização destes fármacos na terapêutica da tuberculose, ou seja, algumas cepas de *M. tuberculosis* apresentam resistência inerente ao contato individual com alguns tuberculostáticos devido a mutações espontâneas no DNA bacteriano (20,21,22). A freqüência de cepas resistentes devido a mutações espontâneas durante a multiplicação do *M. tuberculosis*, em condições ambientais livres de tuberculostáticos, é conhecida para cada fármaco (tabela 2). Por exemplo, existe, aproximadamente, um

mutante resistente à isoniazida para cada milhão de bacilos (10^6) e um mutante para cada cem milhões (10^8) no caso da rifampicina (23). Este fenômeno natural de resistência fez com que o tratamento da tuberculose fosse constituído da utilização combinada de mais de um agente tuberculostático (24,25).

Assim, considerando-se que na TB ativa as lesões cavitárias contêm de 10^7 a 10^9 bacilos (26), que a possibilidade de ocorrer um mutante resistente ao mesmo tempo aos dois principais fármacos tuberculostáticos (H e R) é de um em cem trilhões (10^{14}) de bacilos (27) e que não existe um único gene que codifique para resistência múltipla (tabela 2), a possibilidade da ocorrência de resistência primária, com a utilização de terapia combinada com H + R, é remota.

Por outro lado, a exposição da população bacilar à tratamentos como a monoterapia, erros de prescrições ou o simples abandono do tratamento, são potentes indutores de populações bacilares resistentes.

Tabela 2. Resistência, por mutação espontânea, do *M. tuberculosis* para fármacos de primeira linha.

Tuberculostáticos	Genes envolvidos na mutação	Freqüência de mutações em cepas primárias
Isoniazida	inbA, katG, ahpC	1 em 10^6
Rifampicina	rpoB	1 em 10^8
Pirazinamida	pncA	1 em 10^6
Estreptomicina	rpoL, rrs, strA, S12	1 em 10^7
Etambutol	embA, B & C	1 em 10^5

Quando o MT resistente é encontrado em um paciente que recebeu tratamento com tuberculostáticos por, pelo menos, um mês, é considerado que esse paciente desenvolveu resistência (resistência adquirida ou secundária) e quando o *M. tuberculosis* resistente é encontrado em pacientes que não receberam tratamento prévio com tuberculostáticos, é aceito que esse paciente infectou-se com uma população bacilar primariamente resistente, fenômeno conhecido por resistência primária.

A monoterapia, por exemplo, com isoniazida, após um período que varia de seis a oito semanas, promove a morte dos bacilos sensíveis a este fármaco mas permite a multiplicação de cepas resistentes (resistência adquirida ou secundária). O fenômeno da resistência adquirida é decorrente do crescimento de mutantes naturalmente resistentes ao fármaco, os quais ficam, nestas circunstâncias, em vantagem biológica, passando a predominar nos tecidos do hospedeiro (28). Subseqüentemente, a transmissão desta cepa resistente para outro indivíduo pode acarretar em uma infecção tuberculosa inicialmente resistente (resistência primária).

No geral, todos os fármacos utilizados no tratamento da TB podem ser potentes indutores de cepas de *M. tuberculosis* resistentes. Uma seqüência de eventos indutores de resistência, semelhantes ao exemplo citado da isoniazida, podem levar a uma população bacilar resistente a mais de um fármaco simultaneamente, ou seja, a polirresistência (29). Quando a TB polirresistente for constituída da resistência conjunta à isoniazida e à rifampicina associadas ou não a outros fármacos, utiliza-se a expressão Tuberculose multirresistente (Multidrug Resistance Tuberculosis- MDR-TB).

A emergência de MDR-TB em pacientes infectados com o HIV em hospitais nos Estados Unidos (30,31,32,33,34,35,36,37) e na Europa (38,39,40,41,42,), no início da década de 90, criou um estado de alerta para a emergência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes nos países onde a TB é uma doença endêmica.

Embora o surgimento de MDR-TB na Europa e nos Estados Unidos tenha ocorrido em pacientes infectados pelo vírus HIV, a infecção deste não está definida como um fator preditivo de risco para MDR-TB. O fato é que outras variáveis podem estar relacionadas: infecções nosocomiais, retardo nos diagnósticos e muitos casos em avançado estágio de imunossupressão (36,43,44,45).

Na América Latina a TB nunca deixou de ser um problema sério de saúde pública. Após a emergência de MDR-TB, muitos estudos visando determinar a prevalência de TB resistente aos tuberculostáticos têm sido publicados em diversos países (46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60). No Brasil, a prevalência de MDR-TB tem variado conforme diferentes estados (57,58,59,60). No entanto, esses estudos apresentam delineamentos, tipo de amostragem e variáveis de estudo distintas, dificultando a extrapolação dos dados à população geral do país.

A OMS e a União Internacional Contra a Tuberculose e Doenças do Pulmão (WHO/IUATLD), com a colaboração de profissionais de vários países, realizaram um inquérito global, no período de 1994 a 1997, para avaliar a resistência aos fármacos tuberculostáticos em diferentes países e regiões (61). O estudo encontrou resistência do bacilo da TB nos 35 países inspecionados com significativos níveis para isoniazida (mediana de 7,3%). A prevalência de resistência primária global a qualquer fármaco teve uma variação de 2% a 41%, apresentando uma mediana de 10,4%. A MDR-TB primária foi encontrada em todos os países inspecionados, exceto no Quênia, com uma prevalência mediana de 1,4%, variando de zero por cento (Quênia) a 14% (Latvia). A prevalência de resistência adquirida global teve uma mediana de 36% para qualquer fármaco, com uma faixa de variação de 5,3% (Nova Zelândia) e 100% (Ivanovo Oblast, Rússia). A MDR-TB adquirida apresentou uma mediana de 13%, variando entre zero no Quênia e 54% em Latvia.

A alta prevalência de MDR-TB primária (níveis superiores a 2%), foi encontrada na maioria dos países e regiões em que não existem normas padronizadas para o controle e tratamento da TB e não foi detectada nos locais em que o programa de controle da TB segue, rigorosamente, as normas e estratégias de controle da TB preconizadas pela OMS (61).

O Projeto Global da WHO/IUATLD (61) não estudou a associação entre MDR-TB e infecção causada pelo HIV mas observou baixos índices de MDR-TB em países onde há alta prevalência de tuberculose entre os pacientes HIV-positivos (países africanos, ao sul do Saara) e altos índices de MDR-TB em países onde a taxa de co-infecção MT/HIV, é baixa (países da Europa oriental).

2.3. A Tuberculose no Brasil

O Brasil não segue as estratégias de controle da TB preconizadas pela OMS, porém possui um programa de controle da doença criado pela Divisão Nacional de Tuberculose (DNT) do Ministério da Saúde. As normas de tratamento estão estabelecidas desde 1964. O controle da doença tem como base o tratamento das formas bacilíferas de tuberculose pulmonar. O regime de tratamento consiste no uso de isoniazida, rifampicina e pirazinamida (RHZ) com regime terapêutico de curta duração (seis meses: sendo os dois primeiros meses de RHZ e os quatro meses restantes de RH). O tratamento é essencialmente ambulatorial, sendo realizado na maioria dos casos (85%) na rede pública de saúde.

A TB resistente aos fármacos de primeira linha no Brasil é basicamente adquirida, tendo como principal causa o abandono e a irregularidade do tratamento (62,63). Isso difere do que vem sendo observado nos países industrializados, com baixa prevalência de TB, onde a MDR-TB é principalmente primária e relacionada a pacientes HIV-positivos

e hospitalizados. No inquérito da WHO/IUATLD (61), a prevalência de resistência primária envolvendo mais de um fármaco encontrada no Brasil foi de 2,1%, onde apenas 0,9% é atribuída a MDR-TB (resistência a H+R). A prevalência de polirresistência na forma adquirida foi de 7%, sendo que 5,4% apresentaram resistência conjunta para isoniazida e rifampicina (MDR-TB).

O Rio Grande do Sul possui o Programa de Controle da Tuberculose estadual (PCT/RS), implantado desde 1971, com base conceitual nas diretrizes e nas recomendações da OMS, da IUATLD e da DNT, porém adaptado para a situação epidemiológica e sanitária local. O esquema terapêutico padronizado é o RHZ, também em terapia de curta duração (64). Desde 1980, o tratamento é realizado exclusivamente por serviços públicos e os fármacos são distribuídos gratuitamente. O sucesso do tratamento, segundo a PCT/RS, foi de 72% em 1996 e o coeficiente de óbitos por TB, no mesmo ano, foi de 3,7 por 100.000 habitantes.

A resistência aos tuberculostáticos no estado do Rio Grande do Sul foi estudada no período de 1995 e 1996 em uma amostra de 369 pacientes adultos, com e sem tratamento prévio, tratados em instituições públicas de saúde (59). O resultado desse estudo demonstrou uma prevalência de 4% de polirresistência entre todos os casos estudados e a MDR-TB, nesse grupo, foi de 2,4%. A forma de resistência foi, predominantemente, adquirida. A prevalência de polirresistência adquirida encontrada no RS foi de 13,2%, sendo que 6,6% apresentaram MDR-TB. A prevalência de polirresistência primária encontrada no RS foi de 1,7%, entre estes, 1,4% de MDR-TB. Esse levantamento, no entanto, não avaliou a prevalência de MDR-TB em pacientes infectados com o HIV.

2.4. Diagnóstico laboratorial da tuberculose

Uma das formas de combater a resistência da tuberculose é aumentar a eficácia dos laboratórios clínicos em diagnosticar a doença rapidamente. O laboratório de microbiologia, portanto, tem importante papel não somente na confirmação do diagnóstico da doença mas também no fornecimento de dados para o programa local de controle da tuberculose.

A pesquisa direta do bacilo da TB em materiais biológicos (baciloscopia) apresenta ótimo índice preditivo da doença, especialmente quando na forma pulmonar (66). Assim, esse método tem sido amplamente utilizado e é recomendado pela OMS para o diagnóstico laboratorial da TB. A baciloscopia apresenta especificidade de quase 100%, embora sua sensibilidade seja de aproximadamente 50%, pois, para obter um resultado positivo, são necessários, pelo menos, 5×10^3 bacilos por mililitros de amostra (66).

Deve-se ressaltar que a alta especificidade da baciloscopia associa-se à presença de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR), os quais não representam, necessariamente, o *M. tuberculosis* e que a sensibilidade desta técnica pode se tornar reduzida em fases mais avançadas de imunossupressão. O diagnóstico definitivo da TB, portanto, baseia-se no isolamento e identificação do *M. tuberculosis*, *in vitro* (67). Assim, o isolamento de micobactérias em meio de cultura (exame bacteriológico) é o método mais sensível e específico para o diagnóstico de tuberculose, sendo que dez bacilos por mililitro em espécimes clínicos já podem ser detectados (66).

O exame micobacteriológico convencional mais difundido baseia-se no cultivo de espécimes clínicos no meio de cultura de Löwenstein-Jensen (LJ); meio solidificado a base de ovo contendo glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Esse método é muito demorado, já que várias semanas podem ser

necessárias para que o crescimento de colônias do microorganismo seja visualizada. Portanto, a utilização de novas tecnologias, como culturas em meio líquido, as quais incluem um sistema radiométrico, bem como métodos de biologia molecular (hibridização com sondas genéticas, amplificação através da reação em cadeia da polimerase com "primers" específicos e a análise do ácido micólico por cromatografia líquida de alta resolução) tem aprimorado e tornado mais rápido o isolamento e identificação do *M. tuberculosis* (69).

2.5. Sistema radiométrico

O sistema radiométrico (Bactec 460 TB; Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD), é um método semi-automatizado onde as amostras biológicas, após passarem por um tratamento de descontaminação e digestão, são semeadas em meio líquido 7H12 Middlebrook (frasco Bactec 12B®), que contém um substrato (ácido palmítico) marcado com carbono radioativo (^{14}C). A micobactéria presente na amostra utiliza este substrato e libera como produto de seu metabolismo o dióxido de carbono radioativo ($^{14}\text{CO}_2$), o qual, é detectado pelo instrumento de leitura do Bactec 460TB®. O sistema radiométrico é capaz de realizar o isolamento primário, teste de diferenciação e teste de sensibilidade aos tuberculostáticos de primeira linha em vinte e um dias, enquanto que no exame micobacteriológico convencional são necessárias de oito a dez semanas (69,70,71,72).

O sistema Bactec® permite, em cinco dias de incubação, a diferenciação entre as micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*) e as outras micobactérias (MOTT), utilizando, para isso, o composto p-nitro- α -amino- β -hidroxipropiofenona (NAP), que inibe os organismos pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* enquanto que apresenta pequeno ou nenhum efeito inibidor sobre outras micobactérias (69,73).

Um aspecto prático do isolamento do micobactérias em meio líquido 7H12 Middlebrook, é a possibilidade de realizar uma prova rápida e econômica para a identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis*. Esta prova é fundamentada na propriedade do dimicolato de treolase, glicolípido presente na parede celular do *M. tuberculosis*, formar estruturas microscópicas semelhantes a cordões ou serpentinas ("fator corda"). Este método tem-se mostrado confiável e permite uma rápida informação presuntiva sobre a presença do *M. tuberculosis* (sensibilidade e especificidade superior a 90%) (74,75).

2.6. Teste de Suscetibilidade aos Tuberculostáticos

Outro aspecto laboratorial importante é a realização do teste de suscetibilidade aos tuberculostáticos para o complexo *M. tuberculosis* o qual, por limitações técnicas, é realizado quase que somente em centros de referência. A emergência de MDR-TB tem aumentado a necessidade de laboratórios clínicos determinarem a sensibilidade, pelo menos, aos dois fármacos mais importantes no tratamento da TB, isoniazida e rifampicina. Embora o teste de suscetibilidade aos tuberculostáticos tenha um impacto mínimo no tratamento inicial para pacientes individuais, esse teste deveria ser realizado devido a sua importância epidemiológica no contexto da TB. "O Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) recomenda que isolados clínicos iniciais de todos pacientes tuberculosos sejam testados para os tuberculostáticos de primeira linha. Além disso, é também recomendado pelo CDC que o teste de suscetibilidade seja repetido após três meses de tratamento se o paciente continuar apresentando culturas positivas para o *M. tuberculosis* (67).

O sistema radiométrico (Bactec 460TB®) testa a suscetibilidade aos cinco fármacos de primeira linha: estreptomicina (S), isoniazida (H), rifampicina (R), etambutol (E) e pirazinamida (PZA). O teste de suscetibilidade do sistema Bactec é baseado em

uma versão modificada do método convencional das proporções preconizado por Canetti e colaboradores (76). A proporção crítica para a resistência é dada como 1% para todos os fármacos testados, ou seja, se 1%, ou mais, da população micobacteriana for resistente, a cultura é considerada resistente. Uma particular vantagem do sistema é a possibilidade de testar a suscetibilidade para a PZA, utilizando o meio líquido 7H12 Middlebrook com o pH ajustado em 6,0. O resultado do teste de suscetibilidade no Bactec[®] é fornecido em sete dias sendo, portanto, muito mais rápido que o método convencional das proporções, o qual requer vinte e um dias ou mais, após as três semanas necessárias para o isolamento bacteriano. O teste de suscetibilidade pelo sistema radiométrico possui boa concordância (97%) com o método das proporções (70,71,77,78).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de resistência do complexo *M. tuberculosis* aos tuberculostáticos de primeira linha em pacientes infectados pelo HIV, tratados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a prevalência de MDR-TB em pacientes, infectados pelo HIV, tratados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Determinar as combinações de tuberculostáticos relacionados com a polirresistência na população estudada.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Consenso sobre tuberculose. J. Pneumol 1997; 23 supl.6:322-8.
2. Kapur V, Whittan TS, Musser JM. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15.000 years old? J Infect Dis 1994;170:1348-9.
3. Enarson DA, Murray JF. Global epidemiology of tuberculosis. In: Rom WN, Garay SM, editors. Tuberculosis. New York: Little, Brown; 1995. p. 57-75.
4. Rilley RL, Mills CC, Nyka W, et al. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. Am J Hyg 1959;70:185-96.
5. Dannenberg AM, Jr. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev Infect Dis 1989;11 suppl 2:369-78.
6. Tuberculosis notification update. Weekly Epidemiol Rec 1996;71:65-72.
7. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organisation. Tubercle 1991;72:1-6.
8. World Health Organisation. Global programme on AIDS. The current global situation of de HIV/AIDS pandemic. Weekly Epidemiol Rec 1994;69:189-96.
9. Sudre P, Tem Dam G, Kochi A, et al. Tuberculosis: A global overview of the situation today. Bull WHO 1992;70:149-59.
10. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull WHO 1994;72:213-20.
11. Garay SM. Tuberculosis and the Human Immunodeficiency Virus infection. In: Rom WN, Garay SM, editors. Tuberculosis. New York: Little, Brown; 1995. p. 443-4.

12. World Health Organisation. Global Tuberculosis Control, WHO Report, Geneva, Switzerland 1998.
13. Hijjar MA. Plano emergencial para o controle da Tuberculose no Brasil. Pulmão RJ 1996;5:167-9.
14. Gerhardt Filho G, Hijjar MA. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. J Pneumol 1993;19:4-10.
15. Park MM, Davis AL, Schluger NW, Cohen H, Rom WN. Outcome of MDR-TB patients, 1983-1993. Am J Respir Crit Care Med 1996;153:317-24.
16. Koyanagi Y, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen ISY. Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. Science 1988;241:1673-5.
17. Zhang Y, Nakata K, Rom WN. *Mycobacterium tuberculosis* enhances HIV-1 replication by transcriptional activation of the long terminal repeat. J Clin Invest 1995;95.
18. Neville K, Bromberg A, Bromberg R, et al. The third epidemic-multidrug-resistant tuberculosis. Chest 1994;105:45-8.
19. Rilley LW. Drug-resistant tuberculosis. Clin Infect Dis 1993;17 Suppl 2:442-6.
20. Canetti G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1965;92:687-703.
21. US PHS Cooperative Investigation. Prevalence of drug resistance in previously untreated patients. Am Rev Respir Dis 1964;89:665-71.
22. Hong Kong Government Tuberculosis Service-British Medical Research Council Cooperative Investigation. Drug resistance in patients with pulmonary tuberculosis presenting at chest clinics in Hong Kong. Tubercle 1964;45:77-95.

23. Iseman MD, Madsen LA, Drug-resistant tuberculosis. Clin Chest Med 1989;10:341-53.
24. Cohn ML, Middlebrook G, Russel WF Jr. Combined drug treatment of tuberculosis: prevention of emergence of mutant populations of tubercle bacilli resistant to both streptomycin and isoniazid *in vitro*. J Clin Invest 1959;38:1349.
25. World Health Organisation. Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes. WHO, Geneva, Switzerland 1996. WHO/TB/96.199.
26. Goodwin RA Jr. Editor. Pulmonary Tuberculosis. In: Cecil-Textbook of Medicine. 16th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1982. p. 1542-8.
27. Crotton J and Douglas A. Editors. Some Principles of Chemotherapy. In: Respiratory Diseases, 2nd ed. London: Blackwell Scientific Publications; 1975. p. 95-107.
28. Picon PD, Rizzon CFC, Ott WP. Editores. Tratamento Quimioterápico da Tuberculose. In: Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda; 1993. p. 491-587.
29. Kent JH. The epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis in the United States. Med Clin North Am 1993;77:1391-409.
30. Centres for Disease Control. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons - Florida and New York, 1988-1991. MMWR 1991;40:585-91.
31. Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos GL, et al. An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. Ann Intern Med 1992;117:177-83.
32. Dooley SW, Jarvis WR, Marlone WJ, Snider DE. Multidrug-resistant tuberculosis. Ann Intern Med 1992;117:257-9.

33. Edlin BR, Tokars JL, Grieco MH, et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med* 1992;326:1514-21.
34. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, et al. Exogenous reinfection with advanced HIV infection. *N Eng J Med* 1993;328:1137-44.
35. Frieden T, Sterling T, Pablos Méndez A, et al. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993;328:521-6.
36. Coronado VG, Beck Sague CM, Hutton MD, et al. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1993;168:1052-5.
37. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al. Transmission of tuberculosis in New York City - An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiological methods. *N Eng J Med* 1994;330:1710-6.
38. Monno L, Angarano G, Carbonara S, et al. Emergence of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-infected patients. *Lancet* 1991;337:852.
39. Bouvet E. Transmission nosocomiale de tuberculose multirésistante parmi les patients infectés par le VIH: en France, à Paris. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 1991;45:196-7.
40. Herrera D, Cano R, Godoy P, et al. Multidrug-resistant tuberculosis outbreak on an HIV ward - Madrid, Spain, 1995. *MMWR* 1996;45:330-3.
41. Antunes ML, Aleixo-Dias J, Antunes AF, Pereira MF, Raymundo E, Rodrigues MF. Anti-tuberculosis drug resistance in Portugal. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4 Suppl 3:223-31.

42. Moro ML, Errante I, Infuso A, Sodano L, Gori A, Orcese CA, et al. Effectiveness of infection control measures in controlling a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among HIV patients in Italy. *Int JTuberc Lung Dis* 2000;4 Suppl 1:61-8.
43. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA* 1996; 276:1229-35.
44. Pablos-Méndez A, Sterling TR, Frieden TR. The relationship between delayed or incomplete treatment and all-cause mortality in patients with tuberculosis. *JAMA* 1996;276:1223-8.
45. Rao KV, Iademarco EP, Fraser VJ, Kollef MH. The impact of comorbidity on mortality following in hospital diagnosis of tuberculosis. *Chest* 1998;114:1244-52.
46. Sifuentes Osornio J, Ponce de León LA, Camacho Mezquita FE, Bobadilla del Valle JM, Infante Suárez ML, Ramírez Fernandez N, et al. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos. Características clínicas y factores de riesgo. *Rec Invest Clin* 1995;47 Suppl 4:273-81.
47. Garcia LP, Ferrera A, Galvez CA, Hoffner SE. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and atypical mycobacteria isolated from patients with suspected pulmonary tuberculosis in Honduras. *Chest* 1997;111:148-53.
48. Becerra MC, Freeman JB, Shin SS, Kim JY, Furin JJ, Werner B, et al. Using treatment failure under effective directly observed short-course chemotherapy programs to identify patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4 Suppl 2:108-14.
49. Asencios L, Sanabria H, Diaz S, Quispe N. Resistencia inicial del *M.tuberculosis* a las drogas antituberculosas (1988-1989). *Rec Med Hered* 1993;4 Suppl 2:62-6.

50. Mertz BL, Douce RW, Brito N. Antituberculosis drug resistance in two clinics en Ecuador. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4 Suppl 2:115-7.
51. Orozco LCV, Aparicio Jaramillo G, Quintero de Ramos O, Giraldo de Blanco E, Ulloa de Moreno I, Leon Franco CI. Resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas. *Biomédica* 1981;1 Suppl 3:130-4.
52. Robledo CR, Correa Londoro A, Uribe CM, Mejia GI, Castrillon AL. Resistencia primaria a drogas antituberculosas en Medellin. *Acta Méd Colomb* 1987;12 Suppl 2:62-4.
53. Aita J, Barreira L, Reniero A, López B, Biglione J, Weisburd G, et al. Hospital transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rosario, Argentina. *Medicina* 1996;56 Suppl 1:48-50.
54. Morcillo N, Alito A, Romano MI, Cataldi A, Dolmann A, Reniero A, Kantor IN. Multidrug resistant tuberculosis outbreak in Buenos Aires: DNA fingerprinting analysis of isolates. *Medicina* 1996;56 Suppl 1:45-7.
55. Kantor IN, Latini O, Barrera L. La resistencia y multirresistencia a los medicamentos antituberculosos en la Argentina y en otros paise de America latina. *Medicina* 1998;58 Suppl 2:202-8.
56. Salen JI, Goh KS, Lataiff LRL, Cardoso MSL, Briglia FS. An investigation of primary and acquired drug-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus (Amazonas, Brazil). *J pneumol* 1990;16 Suppl 1:6-8.
57. Ferrazoli L, Palaci M, Marques RM, Jamal LF, Afiune JB, Chimara E, et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4 Suppl 1:18-25.

58. Silva EAM, Sato DN, Telles MAS, Martins MC, Palaci M, Ueki SYM. Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo. Brasil, 1986 a 1990. Rec Inst Adolfo Lutz 1992;52:37-40.
59. Jardim SBV, Ribeiro MO, Castro RM, Ferreira RL. Anti-tuberculosis drug resistance in Rio Grande do Sul State, Brazil. Poster sessions/Global Congress on Lung Health 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 1998; Bangkok, Thailand.
60. Chatkin JM, Bassanesi MC, Leiria BP, Chaieb JA. Resistência inicial do *Mycobacterium tuberculosis* no Rio Grande do Sul. J Pneumol 1981;7 Suppl 4:199-202.
61. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistant surveillance 1994-1997. Geneva, Switzerland 1997. WHO/TB/97.229.
62. Fiuza De Melo FA, Ide Neto J, Seiscento M, Pinto JÁ, Afiune JB. Tuberculose multirresistente. J Pneumol 1993;22:3-8.
63. Seiscento M, Fiuza De Melo FA, Ide Neto J, Noronha AML, Afiune JB, Inomata T, Cruz ML. Tuberculose multirresistente (TBMR): aspectos clínico-laboratoriais, epidemiológicos e terapêuticos. J Pneumol 1997;23 Supl 5:237-44.
64. Ott WP, Guimarães MT, Motta NNR, Camargo AS, Scalcon NRS. Programa de Controle da tuberculose no Rio Grande do Sul. In: Picon PD, Rizzon CFC, Ott WP. Editores. Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda; 1993. p. 53-74.
65. Murray PB, Imore C, Krogstad DJ. The acid-fast stain: a specific and predictive test for Mycobacterial disease. Ann Intern Med 1980;92:512-3.

66. Centro de Referência Professor Hélio Fraga / Centro Nacional de Epidemiologia / Fundação Nacional da Saúde / Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2^o ed. Rio de Janeiro 1994. p. 27-33.
67. Metchock B, Nolte FS, Wallace R. Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: ASM Press; 1999. p. 399-437.
68. Eisenach KD, Cave MD, Crawfordc JT. PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. Diagnostic Molecular Microbiology, principles and applications. Washington: American Society for Microbiology; 1993. p. 191-6.
69. Heifets L. Mycobacteriology laboratory. In: Iseman MD, Huitt GA, editors. Clinics in chest medicine, tuberculosis. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997. p. 35-53.
70. Rastogi N, Goh KS, David HL. Drug susceptibility testing in tuberculosis: a comparison of the proportion method using Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 agar media and a radiometric method. Res Microbiol 1989;140:405-17.
71. Siddiqi SH, Hawkins JE, Laszlo A. Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric procedure and two conventional methods. J Clin Microbiol 1985;22:919-23.
72. Wolfart M, Canabarro R, Willers D, Barcellos S, Barth A.L. Diagnóstico laboratorial de micobactérias: Comparação entre métodos de cultura convencional e radiométrico. XVII Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 1997; Porto Alegre, Brasil.

73. Morgan MA. Evaluation of the p-nitro-a-amino-b-hidroxypropiophenone differential test for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1985;21:634-5.
74. McCarter YS, Ratkiewicz IN, Robinson A. Cord formation in BACTEC medium is a reliable, rapid method for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1998;36:2769-71.
75. Wolfart M, Willers D, Andrade RB, Pilger K, Barcellos S. Método rápido para identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. XIX Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 1999; Porto Alegre, Brasil.
76. Canetti G, Rist N, Grosser J. Mésure de la sensibilité du tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Rec Tuberc Pneumol 1963;27:217.
77. Tarrant JJ, Groschel DHM. Evaluation of the Bactec radiometric method for detection of 1% resistant population of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1985;21:941-6.
78. Salfinger M, Reller B, Demchuck B, et al. Rapid radiometric method for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Rec Microbiol 1989;140:301-9.

Mycobacterium tuberculosis:

**Prevalence of resistant isolates in HIV-positive patients in a
tertiary hospital in southern Brazil**

Marilei Wolfart, BS* and Afonso Luís Barth, Ph.D.**

Unidade de Coleta e Marcação de Exames* and **Unidade de Microbiologia - Serviço de Patologia Clínica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

This study was carried out at "Unidade de Microbiologia" and "Unidade de Pesquisa Biomédica" - Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

This work was partially supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa - Hospital de Clínicas de Porto Alegre ("FIPE").

Corresponding author: Afonso Luís Barth, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Microbiologia - SPC, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90.035-003

Phone: (+51) 33168607 FAX: (+51) 33168310

E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

The aim of our study was to establish the prevalence of resistance in the *M. tuberculosis* complex among patients infected by HIV, in a tertiary hospital in southern Brazil (Hospital de Clínicas de Porto Alegre). A total of 180 isolates of *M. tuberculosis* complex obtained from HIV-positive patients were included in this study. One hundred and forty-six isolates of the *M. tuberculosis*-complex were susceptible to the five drugs tested but 34 isolates were resistant to at least one of the drugs tested. It was possible to identify polyresistance in three patients previously treated (acquired resistance) and in six patients with no previous treatment (primary resistance) with anti-tuberculosis drugs (3 out of 15 [20%] vs. 6 out of 165 [3.6%] $P = 0.03$; $PR = 5.5$; 95% CI 1.5-19.8). It has to be noted that MDR-TB (resistance to both isoniazid and Rifampin, alone or combined with other anti-tuberculosis drugs), was found in three patients; one patient had been previously treated and two had no previous treatment. Resistance to isoniazid was noted in all of the polyresistant tuberculosis cases. In conclusion, the resistance profile of the MT to the anti-tuberculosis drugs among the MT/HIV patients attending our hospital was predominantly acquired. The drug that showed the highest individual resistance rate was isoniazid and this drug was present in all of the polyresistant TB cases. Rifampin showed one of the lowest resistance rates (1.7%), but all of the MT isolates resistant to rifampin were also resistant to isoniazid. The prevalence of either primary (1.2%) or acquired (6.7%) MDR-TB is low among the patients attending Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

KEY WORDS: tuberculosis, Acquired Immunodeficiency Syndrome, MDR-TB, multi-drug resistant, polyresistance, *M. tuberculosis*, HIV-positive

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) persists as an important problem of public health in Brazil. In 1995, a total of 90,665 new cases of the disease were notified to the health ministry indicating an overall incidence of 58.4/100,000 inhabitants (1). Epidemiological studies on TB in this country suggest perspectives of an increment in the number of cases possibly due to deficient health services, worsening of economic conditions and an increase of HIV-positive individuals (2). In fact, TB has been frequently associated with increased morbidity and hospitalization of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) patients. The World Health Organization was expecting, for the end of the nineties, that 14% of the new cases of TB in the world would also be co-infected by the Human Immunodeficiency Virus (HIV).

A major concern about the epidemiological situation of tuberculosis worldwide is the emergence of *M. tuberculosis* (MT) isolates which are resistant to the first choice anti-tuberculosis drugs, in particular, isoniazid and Rifampin , the two most active drugs against MT. As a matter of fact, MT resistant to isoniazid and rifampin (multi-drug resistant tuberculosis-MDR-TB) has already become common and due to the relatively high incidence of MDR-TB in some countries it has been referred as a new epidemic (3,4,5).

The WHO estimated that 50 million people worldwide are infected with MRD-TB and that, 273,000 (3,1%) MDR-TB cases were described among the 8.7 million new tuberculosis cases (6).

The increased incidence of MDR-TB in patients infected by the HIV in the United States (7,8) and in Europe (9,10), where TB is not a disease with high incidence, has warning for the emergence of MDR-TB in countries with high rates of both infections, such as Brazil. Although most of the cases of MDR-TB reported in the US and in Europe have been seen among patients infected by HIV, a direct association between HIV and MDR-TB infections was not clearly established. The fact is that other features (nosocomial infections, delay in the diagnosis of TB, etc.) may be related to the emergence of MDR-TB in HIV positive patients (7,11,12,13).

The World Health Organisation and the International Union against Tuberculosis and Lung Disease – WHO/IUATLD, with the support of professionals of several countries, carried out a project to evaluate the anti-tuberculosis drug resistance from 1994 to 1997 in the world (14). The results indicated the presence of *M. tuberculosis* resistant to at least one anti-tuberculosis drug (isoniazid, streptomycin, rifampin or ethambutol) in all of the 35 countries included in the survey. The resistance rates were particularly increased for isoniazid (median value of 7,3%) and primary resistance varied from 1.5% (Botswana) to 32% (Latvia) while acquired resistance was found to be as low as 5.3% in New Zealand and as high as 70% in Latvia. The study of WHO/IUATLD established that the global primary and acquired MDR-TB median prevalence were 1.4% (range 0% to 14%) and 13% (range 0% to 54%), respectively.

In Brazil, the WHO/IUATLD inquiry found a prevalence of 2.6% of TB resistant to more than one drug (polyresistance). In fact, half of the Brazilian polyresistance was attributed to isoniazid and rifampin multiple resistance - MDR-TB. Primary polyresistance prevalence was 2.1% but only 0,9% were attributed to MDR-TB. On the other hand, acquired MDR-TB prevalence was 5,4%. The study

indicated that resistance among *M. tuberculosis* in Brazil is mostly due to acquired rather than the primary profile. As a matter of fact, Fiuza De Melo *et al* (15) and Seiscento *et al* (16), in previous studies, had already described that the acquired resistance profile in *M. tuberculosis* is predominant among MT in Brazil. The authors also acknowledged that the main causes of the acquired resistance were the irregularity and the abandon of treatment.

Several studies have showed that there are significant differences in the resistance rates of *M. tuberculosis* according to distinct regions in Brazil (17,18,19,20,21,22). The differences seen in the resistance rates are most probably due to many factors which include, in particular, emigrant concentration, demographic density, socio-economic situation, and the regional differences of tuberculosis control strategy.

Resistance of *M. tuberculosis* to anti-tuberculosis drugs in the State of Rio Grande do Sul was evaluated from September 1995 to November 1996, in 369 adult patients from the Public Health Service (21). The results of this study indicated a prevalence of 4% and 2.4% of polyresistance and MDR-TB, respectively. It has to be considered, however, that this study did not attempted to distinguish the MDR-TB prevalence among HIV infected and non-infected patients.

The aim of our study was to establish the prevalence of resistance in the *M. tuberculosis* complex to the five first line anti-tuberculosis drugs (isoniazid, streptomycin, Rifampin , ethambutol or pyrazinamide) and the prevalence of MDR-TB among patients infected by the HIV, in a tertiary hospital in southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

A cross section study was carried out among HIV-positive individuals with diagnosis of tuberculosis confirmed by bacterial culture. The population studied was composed by HIV-positive patients treated at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, located in southern Brazil. HCPA is a 700 bed, tertiary hospital that is a reference center for the treatment of AIDS patients. This study included all positive cultures of the *M. tuberculosis* complex between September 1997 and December 1999. Only one isolate per patient was included in the study. Patients were classified according to sex, age and previous treatment with anti-tuberculosis drugs.

The Zielh-Neelsen stain was used to screen for acid fast bacillus (AFB) (23,24).

Samples from anatomic sites with the presence of normal bacterial flora were submitted to digestion with the mucolytic agent 5% N-acetyl-L-cysteine and to decontamination with 2% sodium hydroxide using the MycoPrep™ kit (BBL™) in a 50 mL screw-cap polypropylene tubes (25,26). These samples were further concentrated by centrifugation (3,000 rpm for 15 min). Samples from sterile sites were concentrated directly by centrifugation as above.

A volume of 1 mL of the concentrated sample was used to inoculate the liquid MiddleBrook medium (Bactec 12B® with Bactec supplement - PANTA®) which was processed by the radiometric method (Bactec System® - Becton Dickinson, Sparks) for culture of *Mycobacterium* spp. In parallel, a volume of 0.2

mL of the concentrated sample was also processed for conventional *Mycobacterium* spp culture using Löwenstein-Jensen medium.

The identification of *M. tuberculosis* complex was performed using the ρ -nitro- α -acetyl-amino- β -hydroxi-propiofenone (27) - NAP test® - in the Bactec System (Becton Dickson).

Positive cultures for the *M. tuberculosis* complex were submitted to susceptibility test for the first line anti-tuberculosis drugs isoniazid (INH), rifampin (RMP), streptomycin (SM), ethambutol (EMB), pyrazinamid (PZA), using the radiometric method (Bactec System®) (28,29). The susceptibility test to PZA was carried out on a modified culture medium with pH set to 6.0 (Bactec® - PZA) (30).

The *M. tuberculosis* strain H37Rv (susceptible to the five drugs tested) was used as a quality control to certify the activity of the first-line anti- tuberculosis agents. The *Mycobacterium bovis* BCG was used to evaluate the resistance to pyrazinamid.

The data of this study were processed confidently to warrant patient's privacy.

RESULTS

One hundred and eighty isolates of *M. tuberculosis* complex obtained from HIV-positive patients (133 males and 47 females) were included in this study. Patients mean age was 33 (14-59) years. One hundred and sixty-five patients (91.7%) had not been previously treated with anti-tuberculosis drugs (group NT) and fifteen patients (8.3%) had reported previous treatment for tuberculosis (group T). A total of 54.4% (98/180) of bacterial isolates was originated from pulmonary sites (sputum and bronchoscope fluids) and 45.5% (82/180) from extra-pulmonary sites (Table 1). It was possible to observe AFB in 41% (74/180) of all studied samples but, as one could expect, we did not detect AFB in pleural fluid neither in bone marrow specimens (Table 1).

One hundred and forty-six isolates of the *M. tuberculosis*-complex (81.1%; 95% CI 74.6-86.6) were susceptible to the five drugs tested. On the other hand, 34 isolates (18.9%; 95% CI 13.5-25.4) were resistance to at least one of the drugs tested (Table 2).

Mono-resistance (resistance to only one drug) of *M. tuberculosis*-complex was observed in 25 out of 180 patients (13.9%; 95% CI 9.2-19.8). The percentages of mono-resistance for each drug tested were 5%, 4.5%, 3.3%, and 1.1% for INH, SM, PZA, and EMB, respectively. Mono-resistance for rifampin (RMP) was not found. Resistance to more than one drug (poly-resistance) was detected in nine patients (5%; 95% CI 2.3-9.3), six males and three females. The mean age of these patients was 31 years.

It was possible to identify polyresistance in three patients previously treated (acquired resistance) and in six patients with no previous treatment (primary resistance) with anti-tuberculosis drugs (3 out of 15 [20%] vs. 6 out of 165 [3.6%] $P = 0.03$; PR = 5.5; 95% CI 1.5-19,8).

We found the following results of multiple resistance in the nine patients: four patients had *M. tuberculosis* complex resistant to INH+SM (2.2%); two patients had INH+RMP resistance (1.1%); one patient had INH+RMP+SM+PZA profile (0.6%); one patient had INH+SM+PZA (0.6%) and the *M. tuberculosis* from the remaining patient presented resistance to the combination INH+PZA (0.6%). It has to be noted that MDR-TB (resistance to both isoniazid and Rifampin , alone or combined with other anti-tuberculosis drugs), was found in three out of 180 patients studied (1.7%; 95% CI 0.4-4.8); one patient (6.7%; 95% CI 0.2-32) was previously treated and two patients (1.2%; 95% CI 0.1-4.3) had no previous treatment (1 out of 15 [6.7%] vs. 2 out of 165 [1.2%] $P = 0.23$; PR = 5.5 95% CI 0.53-57.19). Resistance to INH was noted in all of the polyresistant tuberculosis cases (Table 2).

AFB was positive in four patients (5.4%) with polyresistance and negative in the other five (4.7%).

DISCUSSION

In Brazil, 90% of the adults with tuberculosis display the pulmonary form of the disease. The diagnosis of tuberculosis in most (70%) of these individuals is based solely on the AFB stain (31). The results of this study indicated that 91.7% of the HIV positive patients with tuberculosis had no previous treatment with anti-tuberculosis drugs as well as that *M. tuberculosis* was obtained from many (45.5%) extra-pulmonary sites. This indicates that the MT/HIV patients attending our hospital had not been identified by our regional Tuberculosis Control Program and that almost 50% of them displayed the disseminated form of the disease. Recent local data obtained from “Secretaria Municipal da Saúde de Porto Alegre” (32) indicated that 56.9% of the TB patients who died in 2000 were also co-infected by the HIV virus. Moreover, as many as 75.5% of the TB notifications were made by hospitals which is in agreement with our results. These findings taken together indicated that more efficient and fast techniques are needed to establish the laboratorial diagnosis of TB in early stages.

The results of this study indicated the existence of *M. tuberculosis* which are resistant to first line anti-tuberculosis drugs in HIV-positive patients treated at our hospital. The resistance was predominantly acquired as most of the patients infected with resistant *M. tuberculosis* had received previous treatment with anti-tuberculosis drugs. In fact, the prevalence of acquired polyresistance (20%) was significantly higher than primary polyresistance (3.6%); $P = 0.03$; RP 5.5 (IC95% 0.05-0.65), i.e., TB polyresistant among patients previously treated with anti-tuberculosis drugs is 6 times greater than polyresistance among patients with no

previous treatment. This data demonstrate the importance to perform routine *in vitro* susceptibility tests of MT from patients previously treated with anti-tuberculosis drugs in our institution as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention (25,34).

The acquired resistance was also described in the outpatients surveyed by the Public Health Network of our State from 1995 to 1996 (23). This type of resistance among isolates of TB is, in fact, the predominant profile of resistance found in *M. tuberculosis* in other regions of Brazil (16,17,18).

There was no statistical difference for acquired or primary polyresistance outcome in association with sex, age, and positivity of AFB ($P > 0.05$) of the TB patients.

The drug that showed the highest individual resistance rate (10%) among all the other drugs was isoniazid and this drug was present in all of the polyresistant TB cases. Rifampin showed one of the lowest resistance rates (1.7%), but all of the MT isolates resistant to rifampin were also resistant to isoniazid (INH+RMP resistance). The low rate of resistance to rifampin among the patients attending our hospital may be due to the fact that rifampin was used for the treatment of TB patients only after 1977 in our State (35) and that this drug is restricted to the treatment of tuberculosis.

The low prevalence of INH+RMP resistance (1.7%) in our study indicates that MDR-TB does not represent a significant problem to our regional TB Management Program, as yet. However, it is known that within a population of TB bacilli resistant to isoniazid, spontaneous mutations may occur, with considerable frequency, leading to resistance to rifampin (36). Therefore, one could consider

that as many as 10% (the individual resistance rate to isoniazid) of the patients from our study are at risk to become infected with MDR-TB whether they receive treatment with isoniazid and Rifampin .

It has also to be mentioned that the IC 95% for resistance to both INH+RMP in our study included a considerable interval (from 0.4 to 4.8%) and this indicates that we need to evaluate a larger number of MT/HIV patients to establish a more accurate figure of the MDR-TB in our hospital.

According to the WHO (14), primary MDR-TB, i.e., INH+RMP resistance, higher than 2% is associated to inefficiency of both the therapeutic regimen employed and the TB management local programs. In our study the primary MDR-TB prevalence was only 1.2% (95%IC 0.1-4.4) and, therefore, can be considered low. This resistance level is not statistically different ($P = 0.05$) from the primary MDR-TB prevalence (1.4%) among the general tuberculous population attending the clinics of State of RS Public Health Network (21). This result indicates that, in our population, there was no association between MDR-TB and HIV infection and, therefore, implies that HIV-positive patients are not at higher risk to acquire primary MDR-TB. This is in accordance with the results of the WHO/IUATLD Global Project (14,37) which described low rates of MDR-TB in countries with high rates of HIV-infected patients.

Technique Limitation

Routine laboratory tests used for the identification of *M. tuberculosis* (including the NAP test performed in this study) do not distinguish within the four

mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* and *Mycobacterium microti*). Therefore, the resistances rates detected in this study may not be exclusively due to the species *M. tuberculosis*. Due to the fact that there are no reports in the literature about human infection caused by *M. africanum*. However, it was described that *M. microti* causes pulmonary TB in immunocompetent patients (38) and *M. bovis* was identified as the real etiologic agent of some MDR-TB cases of HIV-positive patients in European hospitals (39,40). In fact, Bolvet and co-workers (39) found some isolates of multidrug resistant *M. bovis* in five patients treated at a hospital in Paris, showing possibility of transmission of such microorganism among humans. It is, therefore, possible to consider that some cases identified as *M. tuberculosis* complex in our study are, in fact, due to *M. bovis*.

A genetic feature of *M. bovis* is the intrinsic resistance to PZA. It is, therefore, important to emphasise that in this study, six isolates displayed resistance only to PZA, and another three showed resistance to PZA combined with other drugs. It is possible to speculate that one or more of the PZA resistant *Mycobacterium sp* are *M. bovis* although no additional tests were carried out to differentiate *M. bovis* from the *M. tuberculosis* complex.

There are no reports in the local literature about the prevalence of *M. bovis* in human beings and it would be of interest to establish the prevalence of *M. bovis* within the *M. tuberculosis* complex in order to determine a possible trend increased resistance to PZA, as well as MDR-TB, related to *M. bovis* species.

In conclusion, the resistance profile of the MT to the five first-line antituberculosis drugs among the MT/HIV patients attending our hospital was

predominantly acquired as most of the patients infected with resistant *M. tuberculosis* had received previous treatment with anti-tuberculosis drugs. The prevalence of either primary (1.2%) or acquired (6.7%) MDR-TB is low among the patients attending our hospital. The drug that showed the highest individual resistance (10%) rate among all the other drugs was isoniazid and this drug was present in all of the polyresistant TB cases. Rifampin showed one of the lowest resistance rates (1.7%), but all of the MT isolates resistant to rifampin were also resistant to isoniazid (INH+RMP resistance).

REFERENCES

1. Hijjar MA. Plano emergencial para o controle da Tuberculose no Brasil. *Pulmão RJ* 1996;5:167-9.
2. Gerhardt Filho G, Hijjar MA. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. *J Pneumol* 1993;19:4-10.
3. Neville K, Bromberg A, Bromberg R, et al. The third epidemic-multidrug-resistant tuberculosis. *Chest* 1994;105:45-8.
4. Riley LW. Drug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1993;17 Suppl 2:442-6.
5. Kent JH. The epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis in the United States. *Med Clin North Am* 1993;77:1391-409.
6. Dye C, Espinal MA, Watt CJ et al. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis* 2002;185(8):1197-202.
7. Centers for Disease Control. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons - Florida and New York, 1988-1991. *MMWR* 1991;40:585-91.
8. Edlin BR, Tokars JL, Grieco MH, et al. An outbreak of multi-drug resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med* 1992;326:1514-21.
9. Monno L, Angarano G, Carbonara S, et al. Emergence of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-infected patients. *Lancet* 1991;337:852.

10. Bouvet E. Transmission nosocomiale de tuberculose multirésistante parmi les patients infectés par le VIH: en France, à Paris. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 1991;45:196-7.
11. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. JAMA 1996;276:1229-35.
12. Pablos-Méndez A, Sterling TR, Frieden TR. The relationship between delayed or incomplete treatment and all-cause mortality in patients with tuberculosis. JAMA 1996;276:1223-8.
13. Rao KV, Iademarco EP, Fraser VJ, et al. The impact of comorbidity on mortality following in-hospital diagnosis of tuberculosis. Chest 1998;114:1244-52.
14. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistant surveillance 1994-1997. WHO, Geneva, Switzerland 1997. WHO/TB/97.229.
15. Fiuza De Melo FA, Ide Neto J, Seiscento M, et al. Tuberculose multirresistente. J Pneumol 1993;22:3-8.
16. Seiscento M, Fiuza De Melo FA, Ide Neto J, et al. Tuberculose multirresistente (TBMR): aspectos clínico-laboratoriais, epidemiológicos e terapêuticos. J Pneumol 1997;23 Supl 5:237-44.

17. Salen JI, Goh KS, Lataiff LRL, et al. An investigation of primary and acquired drug-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus (Amazonas, Brazil). J Pneumol 1990;16 Suppl 1:6-8.
18. Ferrazoli L, Palaci M, Marques RM, et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. Int J Tuberc Lung Dis 2000;4 Suppl 1:18-25.
19. Silva EAM, Sato DN, Telles MAS, et al. Resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* from São Paulo State, Brazil, 1986 to 1990. Rev Inst Adolfo Lutz 1992;52(1/2):37-40.
20. Chatkin JM, Bassanesi MC, Leiria BP, et al. Initial resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Rio Grande do Sul. J Pneumol 1981;7 Suppl 4:199-202.
21. Jardim SBV, Ribeiro MO, Castro RM, et al. Anti-tuberculosis drug resistance in Rio Grande do Sul State, Brazil. Poster sessions/Global Congress on Lung Health 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 1998 Nov 23-26; Bangkok, Thailand.
22. Pinto WP, Hadad DJ, Silva Telles MA, et al. Tuberculosis and drug resistance patients seen at an AIDS Reference Center in São Paulo, Brazil. Int J Infect Dis 2001;5(2):93-100.
23. Murray PB, Imore C, Krogstad DJ. The acid-fast stain: a specific and predictive test for Mycobacterial disease. Ann Intern Med 1980;92:512-3.
24. Centro de Referência Professor Hélio Fraga / Centro Nacional de Epidemiologia / Fundação Nacional da Saúde / Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2^o ed. Rio de Janeiro 1994. p. 27-33.

25. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta; 1985.
26. Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, et al. Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Cood. Ed., Weissfeld AS. Cumitech 16A. American Society for Microbiology, Washington; 1994.
27. Morgan MA. Evaluation of the p-nitro-a-amino-b-hidroxypropiofenone differential test for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1985;21:634-5.
28. Rastogi N, Goh KS, David HL. Drug susceptibility testing in tuberculosis: a comparison of the proportion method using Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 agar media and a radiometric method. Res Microbiol 1989;140:405-17.
29. Siddiqi SH, Hawkins JE, Laszlo A. Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric procedure and two conventional methods. J Clin Microbiol 1985;22:919-23.
30. Salfinger M, Reller B, Demchuck B, et al. Rapid radiometric method for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Res Microbiol 1989;140:301-9.
31. Gutierrez RS, Ott WP, Picon PD. Métodos Diagnósticos. In: Picon PD, Rizzon CFC, Ott WP , editores. Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda; 1993. p. 491-587.

32. Jobim R, Wiederkehr P, Lopes R. A co-infecção tuberculose/HIV no município de Porto Alegre. Boletim Epidemiológico – Ano IV, nº 12, ago 2001.
33. Metchock B, Nolte FS, Wallace R. Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: ASM Press; 1999. p. 399-437.
34. Fietta A, Cascina A, Meloni F, et al. A 10-years survey of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Pavia and their drug resistance: a comparison with other Italian reports. J Chemother 2002;14(1):33-40.
35. Ott WP. Bases essenciais para controle da doença. In: Picon PD, Rizzon CFC, Ott WP, editores. Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda; 1993. p. 03-19.
36. Frieden T, Sterling T, Pablos Méndez A, et al. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. N Engl J Med 1993;328:521-6.
37. Espinal MA, Laserson K, Camacho M, et al. Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. Int J Tuberc Lung Dis 2001;5(10):887-93.
38. Niemann S, Richter E, Dalügge-Tamm H, et al. Two cases of *Mycobacterium microti*-derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. CDC Vol. 6, N°5 Sep-Oct 2000.
39. Bolvet E, Casalino E, Mendoza-Sassi G, et al. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. A case-control study. AIDS 1993;7:1453-60.

40. Blázquez J, Espinosa de Los Monteros LE, Samper S, et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak Human Immunodeficiency Virus-positive patients. J Clin Microbiol 1997;35:1390-3.

Table 1. Distribution of clinical specimens according to patients treated (T patients) and not treated (NT patients) with anti-tuberculosis drugs and AFB smears results

Specimen	Total of patients	NT patients	T patients	AFB Positive
Sputum	44 (24.4%)	39 (21.6%)	5 (2.8%)	23 (12.8%)
Bronchoscopy fluid	54 (30%)	50 (27.8%)	4 (2.2%)	27 (15%)
Linfonodo	36 (20%)	33 (18.3%)	3 (1.7%)	14 (7.8%)
Pleural fluid	18 (10%)	15 (8.3%)	3 (1.7%)	0 (0%)
Cerebrospinal fluid	12 (6.6)	12 (6.6%)	0 (0%)	3 (1.6%)
Exudates	9 (5%)	9 (5%)	0 (0%)	7 (3.9%)
Bone marrow	3 (1.6%)	3 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Other (synovial, stool)	4 (2.2%)	4 (2.2%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	180 (100%)	165 (91.7%)	15 (8.3%)	74 (41%)

Table 2. Prevalence of drug resistance of the *M. tuberculosis* complex among MT/HIV patients attending Hospital de Clínicas de Porto Alegre

	Total patients	NT patients	T patients
Total of isolates tested	180 (100%)	165 (91.75%)	15 (8.3%)
Susceptible to all 5 drugs	146 (81.1%)	138 (83.6%)	8 (53.3%)
		Primary resistance	Acquired resistance
Any resistance	34 (18.9%)	27 (16.6%)	7 (46.7%)
Isoniazid (INH)	18 (10%)	12 (7.3%)	6 (40%)
Rifampin (RMP)	3 (1.7%)	2 (1.2%)	1 (6.7%)
Ethambutol (EMB)	2 (1.1%)	2 (1.2%)	0 (0%)
Streptomycin (SM)	14 (7.8%)	13 (7.8%)	1 (6.7%)
Pyrazinamide (PZA)	9 (5%)	7 (4.3%)	2 (13.3%)
Mono-resistance*	25 (13.9%)	21 (2.8%)	4 (26.7%)
Isoniazid (INH)	9 (5%)	6 (3.6%)	3 (20%)
Rifampin (RMP)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ethambutol (EMB)	2 (1.1%)	2 (1.2%)	0 (0%)
Streptomycin (SM)	8 (4.5%)	8 (4.9%)	0 (0%)
Pyrazinamide (PZA)	6 (3.3%)	5 (3%)	1 (6.7%)
	9 (5%)	6 (3.6%)	3 (20%)
Poly-resistance**	95%IC 2.3-9.3		
	3 (1.7%)	2 (1.2%)	1 (6.7%)
MDR-TB***	95%IC 0.4-4.8	95%IC 0.1-4.4	95%IC 0.2-31.9
INH+RMP	2 (1.1%)	1 (0.6%)	1 (6.7%)
INH+RMP+SM+PZA	1 (0.6%)	1 (0.6%)	0 (0%)
Other patterns			
INH+SM	4 (2.2%)	3 (1.8%)	1 (6.7%)
INH+SM+PZA	1 (0.6%)	1 (0.6%)	0 (0%)
INH+PZA	1 (0.6%)	0 (0%)	1 (6.7%)

* Mono-resistance: isolate resistant to only one of the five drugs tested.

** Poly-resistance: isolate resistant to more than one of these drugs.

*** MDR-TB: isolate resistant to both INH and RMP, with or without resistance to additional agents.

Mycobacterium tuberculosis:

**PREVALÊNCIA DE CEPAS RESISTENTES EM
INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS**

Marilei Wolfart* e Afonso Luís Barth**

* Farmacêutica-Bioquímica da Unidade de Marcação e Coleta de Exames _ Serviço de Patologia Clínica _ Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Medicina _ Ciências Médicas.

** PhD em Microbiologia Clínica. Chefe da Unidade de Microbiologia - Serviço de Patologia Clínica _ Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Professor Adjunto do Departamento de Análises _ Faculdade de Farmácia _ Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professor permanente do Programa de Pós-Graduação em Medicina _ Ciências Médicas _ Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Este trabalho foi realizado na Unidade de Microbiologia - Serviço de Patologia Clínica _ Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, apoiado parcialmente pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e ensino do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE).

Uma versão preliminar deste estudo foi apresentado na sessão de pôster do 4 th International Conference of the Hospital Infection Society, Edimburgo (Escócia) 1998.

Pedidos de separatas para Farmacêutica/Bioquímica Marilei Wolfart, Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brasil. CEP. 90035-003. E-mail. albarth@hcpa.ufrgs.br

RESUMO:

Introdução: A infecção causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MT) tem sido causa comum de aumento da morbidade e hospitalização dos pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana. Além disso, o ressurgimento global da tuberculose tem sido acompanhada por um preocupante incremento da prevalência de tuberculose resistente a mais de um fármaco (polirresistência) e, mais especificamente, a resistência combinada à rifampicina e à isoniazida (MDR-TB). A resistência do MT no Brasil assume diferentes índices nas diferentes regiões do país e pouco se conhece quanto a resistência do bacilo em pacientes co-infectados pelo vírus HIV (MT/HIV).

Objetivo: Determinar a prevalência de resistência do complexo *M. tuberculosis* aos cinco tuberculostáticos de primeira linha e a prevalência de MDR TB em pacientes co-infectados MT/HIV.

Delineamento: Estudo transversal.

Materiais e Métodos: MT isolados de pacientes HIV positivos tratados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram testados para avaliar a suscetibilidade aos tuberculostáticos usando o sistema radiométrico (Bactec® 460 TB). Os fármacos examinados e as concentrações críticas utilizadas foram: isoniazida (H) 0,1 µg/mL, rifampicina (R) 2 µg/mL, estreptomicina (S) 2 µg/mL, etambutol (E) 2,5 µg/mL e pirazinamida (PZA) 100 µg/mL .

Resultados: Um total de 180 pacientes foi avaliado e 18,9% (34/180) apresentaram isolados bacterianos resistentes a pelo menos um fármaco. A resistência apresentou a seguinte distribuição de prevalências: (i) 10%, 7,8%, 5%, 1,7% e 1,1% de resistência isolada para H, S, PZA, R e E, respectivamente; (ii) 5% (9/180) de polirresistência, 3,6% (6/165) na forma primária e 20% (3/15) na forma adquirida; (iii) 1,7% (3/180) de MDR-TB (resistência conjunta à H e R), 1,2% (2/165) na forma primária e 6,7% (1/15) na forma adquirida.

Conclusão: A resistência do complexo *M. tuberculosis* aos cinco tuberculostáticos de primeira linha encontrada em pacientes co-infectados MT/HIV tratados no HCPA foi predominantemente adquirida. A prevalência de MDR-TB seja na forma primária (1,2%) ou adquirida (6,7%) é baixa nos pacientes HIV positivos tratados no HCPA

Palavras chaves: Tuberculose multirresistente; polirresistência; tuberculose; MDR-TB; *Mycobacterium tuberculosis*; HIV-positivo; SIDA.

Abreviaturas: MDR-TB = tuberculose multirresistentes (resistente conjunta à isoniazida e rifampicina); H = isoniazida; R = rifampicina; S = estreptomicina; E = etambutol; PZA = pirazinamida.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) persiste como um importante problema de saúde pública no Brasil. Em 1995, foram notificados 90.665 casos novos, com um coeficiente de incidência de 58,4/100.000 habitantes (1). Os estudos epidemiológicos da TB no país apontam para perspectivas de aumento no número de casos em decorrência da deficiência dos serviços de saúde, piora das condições econômicas e aumento da incidência de indivíduos infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (2). A Organização Mundial de Saúde estimou, para o final da década de 90, que 14% dos casos novos de TB no mundo seriam atribuídos a co-infectados pelo vírus HIV.

Outro agravante da situação epidemiológica da doença tuberculose, é a emergência de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MT) resistentes aos tuberculostáticos de primeira linha para o tratamento da doença, em especial à resistência aos dois fármacos mais ativos, isoniazida e rifampicina (MDR-TB) (3,4,5).

A emergência, sem precedente, de MDR-TB em pacientes infectados com o HIV nos Estados Unidos (6,7,8,9,10,11) e na Europa (12,13,14,15,16,17), onde a TB não é uma doença de grande incidência, criou um estado de alerta para o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes em países onde existem altas taxas das duas infecções, como no Brasil. A direta associação entre a infecção pelo HIV e a MDR-TB não está bem definida, embora o maior número de casos relatados nos EUA e na Europa tenham ocorrido em pacientes infectados pelo vírus HIV. O fato é que outras variáveis devem estar relacionadas como as

infecções nosocomiais, como o retardo de diagnóstico e muitos casos avançados de SIDA (6,10,18,19,20).

A Organização Mundial de Saúde e a União Internacional Contra a Tuberculose e Doenças do Pulmão ("World Health Organization" e a "International Union Against Tuberculosis and Lung Disease" - WHO/IUATLD), com a colaboração de profissionais de vários países, realizaram um inquérito global, no período de 1994 a 1997, para avaliar a resistência aos fármacos tuberculostáticos no mundo e nos seus diferentes países e regiões (21). Este estudo, encontrou resistência do bacilo da TB nos 35 países inspecionados com significativos níveis de resistência para isoniazida (mediana de 7,3%): resistência primária com uma faixa de variação de 1,5% (Botswana) a 32% (Látvia) e resistência adquirida variando de 5,3% (Nova Zelândia) a 70% (Látvia). A prevalência de MDR-TB primária apresentou uma mediana de 1,4%, (faixa de variação de 0%-14%) e a mediana de MDR-TB adquirida foi de 13% (faixa de variação de 0%-54%).

No Brasil, o inquérito da WHO/IUATLD (21) encontrou, entre todos os casos estudados, uma prevalência de 2,6% de TB resistente a mais de um fármaco (polirresistência), onde a metade foi atribuída a múltipla resistência à isoniazida e rifampicina (MDR-TB). A prevalência de resistência a mais de um fármaco na forma primária (polirresistência primária) foi de 2,1%, onde, apenas 0,9% foi atribuída à MDR-TB. A prevalência de polirresistência adquirida foi de 7%, sendo que 5,4% apresentaram resistência conjunta para isoniazida e rifampicina (MDR-TB). Este estudo demonstrou que a resistência do bacilo da TB, no Brasil, é, principalmente, adquirida. Fiuza De Melo e Seiscento (22,23), em estudos anteriores, já haviam descrito o perfil de resistência predominantemente

adquirida, tendo como principal causa o abandono e a irregularidade do tratamento.

Alguns estudos têm demonstrado diferenças significativas nos índices de resistência do *M. tuberculosis* nos diversos grupos e regiões do País (24, 25,26,27,28), provavelmente, decorrentes de peculiaridades na formação das diferentes populações brasileiras (concentração de imigrantes, densidade demográfica, situação sócio-econômica e diferentes adaptações regionais dos programas de controle da tuberculose, entre outros).

A resistência do *M. tuberculosis* aos tuberculostáticos no estado do Rio Grande do Sul (RS) foi estudada no período de 1995 e 1996, em 369 pacientes adultos provenientes de ambulatórios da rede pública (28). O resultado deste estudo encontrou uma prevalência de resistência a mais de um fármaco de 4% entre todos os casos estudados, sendo que, a prevalência de MDR-TB foi de 2,4%. Este levantamento, no entanto, não estratificou a prevalência de MDR-TB em pacientes infectados e não infectados com o HIV.

A ausência de dados locais quanto à resistência do *M. tuberculosis* em pacientes infectados pelo HIV e a hipótese de que, nesta população, a prevalência de MDR-TB pudesse ser maior que a encontrada na população de tuberculosos tratados na rede ambulatorial de saúde, foram as razões pelas quais o presente estudo foi realizado.

Este estudo determinou a prevalência da resistência do complexo *M. tuberculosis* aos cinco tuberculostáticos de primeira linha (isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina e pirazinamida) e a prevalência de MDR-TB em pacientes infectados pelo HIV.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal entre os pacientes HIV-positivos com diagnóstico de tuberculose, confirmada por cultura bacteriana. A população estudada foi composta por pacientes HIV-positivos tratados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizado no extremo sul do Brasil, considerado referência regional e nacional em SIDA. Foram estudadas todas as culturas positivas para o complexo *M. tuberculosis* isoladas na Unidade de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica, no período de setembro de 1997 a dezembro de 1999. Foram excluídas amostras de um mesmo paciente, colhidas em um intervalo de tempo inferiores a três meses. O estudo foi estratificado segundo os seguintes fatores, obtidos mediante consultas a prontuários: sexo, idade, tratados previamente com fármacos tuberculostáticos (T) e não tratados (NT).

Todos os materiais biológicos foram submetidos à pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) pelo método de Ziehl-Neelsen (29,30). As amostras de sítios estéreis foram concentradas por centrifugação (3.000 R.P.M. por 15 minutos). As amostras oriundas de sítios anatômicos com presença de flora bacteriana normal, foram transferidas para tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL, com tampa rosca e submetidos à digestão com o agente mucolítico *N*-acetil-L-cisteína e à descontaminação com hidróxido de sódio 2% (kit de digestão/descontaminação BBL™ MycoPrep™) (31,32) e posteriormente, foram concentradas por centrifugação

(3.000 R.P.M. por 15 minutos). Para a cultura de micobactérias foram semeados uma alíquota de 1 mL de cada concentrado da amostra em meio Middlebrook líquido (frasco Bactec 12B® com o suplemento Bactec PANTA®) o qual foi processado no Sistema Bactec® (método radiométrico). Outra alíquota de 0,2 mL foi semeada no meio de Löwenstein-Jensen o qual foi incubado a 37°C em atmosfera ambiente (método convencional). A identificação do complexo *M. tuberculosis* foi realizada através do teste com o agente inibidor *p*-nitro- α -acetil-amino- β -hidroxipropiofenona (Bactec NAP®) (33).

As culturas positivas para o complexo *M. tuberculosis* foram submetidas ao teste de susceptibilidade para os tuberculostáticos utilizando o método radiométrico (Sistema Bactec®) (34,35,36). Os fármacos examinados e as concentrações críticas utilizadas foram: isoniazida (H) 0,1 μ g/mL, rifampicina (R) 2 μ g/mL, estreptomicina (S) 2 μ g/mL, etambutol (E) 2,5 μ g/mL, e pirazinamida (PZA) 100 μ g/mL. O teste de susceptibilidade à PZA foi realizado em meio de cultura modificado com o pH ajustado em 6,0 (Bactec®_PZA) (37).

A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (sensível aos cinco fármacos testados) foi utilizada como controle de qualidade para verificar a atividade dos tuberculostáticos testados. O *Mycobacterium bovis* BCG foi utilizado para verificar a resistência à pirazinamida.

ANÁLISE DE DADOS

Inicialmente foi calculado o percentual geral de resistência de *M. tuberculosis* aos cinco tuberculostáticos de primeira linha e seus intervalos de confiança de 95% (95%IC) para estimativa de parâmetro populacional. Em seguida, foram obtidos os percentuais de resistência estratificados seguindo os fatores em estudo. Estes percentuais foram comparados através do teste do Qui-quadrado e Exato de Fisher, quando necessário. Adicionalmente, para avaliar a força de associação, foi calculada a Razão de Prevalência (RP) e seus IC 95%. Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas EPI INFO v. 6,0 e PEPI v. 3,0. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os dados deste estudo foram processados de forma confidencial e garantindo o anonimato dos indivíduos pesquisados. Foi permitido, às equipes médicas responsáveis pelos pacientes, o acesso aos resultados dos exames laboratoriais realizados neste estudo, com o objetivo de auxiliar o tratamento da tuberculose.

RESULTADOS

Inicialmente foram selecionados 187 pacientes, sendo que sete destes foram excluídos: cinco pacientes por não ser possível obter confirmação da positividade sorológica para o teste anti-HIV e dois pacientes por não ter sido obtido cultura bacteriana viável para o teste de susceptibilidade. Dos 180 pacientes incluídos no estudo 133 foram do sexo masculino e 47 do sexo feminino. A média de idade dos pacientes foi de 33 anos (intervalo de 14 a 59 anos). Cento e sessenta e cinco pacientes (91,7%) não apresentaram histórico de tratamento prévio com tuberculostáticos (NT) e quinze pacientes (8,3%) apresentaram relatos de tratamento prévio para tuberculose (T) (tabela 1). Um total de 54,4% (98/180) dos isolados bacterianos foram oriundos de sítios pulmonares (escarro e lavado bronco alveolar) e 45,6% (82/180) de sítios extra-pulmonares (tabela 1). A pesquisa do BAAR foi positiva em 41% (74/180) do total de amostras estudadas, sendo que nenhuma das amostras de líquido pleural e medula óssea apresentaram pesquisa de BAAR positiva em contraste com as amostras de abscessos e biópsias, das quais, sete de nove amostras foram BAAR positivas (tabela 2).

Centos e quarenta e seis isolados bacterianos (81,1%; 95%IC 74,6-86,6) apresentaram sensibilidade, *in vitro*, aos cinco fármacos testados e 34 (18,9%; 95%IC 13,5-25,4) apresentaram resistência a pelo menos um dos fármacos testados. A resistência isolada à cada tuberculostático testado foi de 10%, 7,8%, 5%, 1,7% e 1,1% para H, S, PZA, R e E, respectivamente (tabela 3).

Monorresistência (resistência a apenas um fármaco) foi observada em 25/180 pacientes (13,9%; 95%IC 9,2-19,8). Os percentuais de monorresistência encontrados para cada fármaco testado foram os seguintes: 5,0%, 4,5%, 3,3% e 1,1% para H, S, PZA e E, respectivamente. Não foi encontrada monorresistência para a rifampicina.

Nas análises das variáveis NT e T o estudo encontrou a prevalência de 16,4% de resistência primária e 46,7% de resistência adquirida entre todos os pacientes estudados. A isoniazida apresentou o índice de 7,3% de resistência primária e 40% de resistência adquirida (tabela 3).

A resistência a mais de um tuberculostático (polirresistência) foi detectada em nove pacientes (5,0%; 95%IC 2,3-9,3), seis do sexo masculino e três do sexo feminino. A média de idade dos pacientes que apresentaram polirresistência foi de 31 anos. A pesquisa do BAAR foi positiva em quatro pacientes e negativa nos outros cinco. A prevalência de polirresistência em pacientes tratados previamente com tuberculostáticos (resistência adquirida) foi de 20% e a prevalência de polirresistência encontrada nos pacientes sem tratamento prévio para a TB (resistência primária) foi de 3,6% (RP = 5,5; 95%IC 1,5-19,8; P = 0,03).

As combinações de fármacos encontrada nos nove pacientes com resistência a mais de um tuberculostático foram: H+S em 4/180 (2,2%); H+R em 2/180 (1,1%); H+R+S+PZA em 1/180 (0,6%); H+S+PZA em 1/180 (0,6%) e a combinação de H+PZA em 1/180 (0,6%). A resistência à isoniazida foi observada em todos os casos de tuberculose polirresistente.

A MDR-TB (resistência conjunta à H+R combinada ou não à outros fármacos) foi encontrada em três entre os 180 pacientes estudados (1,7%) (tabela

3), sendo que um paciente descreveu tratamento prévio com tuberculostáticos e dois não indicaram tratamento prévio (1/15 [6,7%] vs. 2/165 [1,2%] RP = 5,5; 95%IC 0,53-57,2, P= 0,23).

DISCUSSÃO

No Brasil, 90% dos casos de TB primária em adultos se apresentam nas formas pulmonares e destes, 70% podem ser diagnosticados pela baciloscopia direta, exame altamente difundido na rotina de saúde pública (38). Avaliando a composição da amostra estudada no HCPA, podemos observar que 91,7% dos pacientes não foram tratados com tuberculostáticos anteriormente e que o *M. tuberculosis* foi isolado de vários sítios extra-pulmonares (45,5%). Isto demonstra que os pacientes co-infectados MT/HIV do HCPA não foram diagnosticados previamente pela estrutura ambulatorial de assistência do Programa de Controle da Tuberculose e estão, em quase 50% dos casos, relacionados às formas disseminadas da doença. Dados recentes sobre a epidemiologia da TB (39), divulgados pela Secretaria Municipal da Saúde de Porto Alegre, mostraram que 56,9% dos óbitos ocorridos entre os casos novos de TB no ano de 2000 foram de pacientes MT/HIV co-infectados e que da totalidade de notificações de casos novos de TB com co-infecção MT/HIV, 75,5% foram feitas por hospitais, corroborando o observado na amostra estudada. Estes achados reforçam a urgente necessidade da aplicabilidade de técnicas mais rápidas e mais precisas para o diagnóstico laboratorial da TB na sua fase primária.

Os níveis de resistência encontrados neste estudo mostraram a existência de populações bacilares do complexo *M. tuberculosis* resistente aos tuberculostáticos de primeira linha em pacientes HIV-positivos tratados no HCPA.

A resistência observada foi, predominantemente, adquirida. Esse tipo de resistência foi a mesma observada em estudo realizado em pacientes tuberculosos tratados nos ambulatórios da rede pública do estado do RS no período de 1995 a 1996 (28) (tabela 4) e reforça os dados de outros estudos que indicam que este perfil é o predominante no Brasil (21,22,23).

A rifampicina apresentou uma das menores taxa de resistência (1,7%) e não demonstrou índices de monorresistência. Isto se deve provavelmente por ser esse fármaco, usada em programas de saúde pública no Rio Grande do Sul, somente a partir de 1977 (40) e ao fato de seu uso estar restrito ao tratamento da TB. No entanto, 10% do total de casos estudados apresentaram resistência a isoniazida e este fármaco esteve presente em 100% dos casos de TB polirresistente. Nesta população o tratamento com H+R poderá selecionar cepas resistentes para ambos os fármacos (9) elevando, consideravelmente, a prevalência de MDR-TB.

A prevalência de TB resistente a mais de um fármaco na forma adquirida (20%) foi significativamente maior do que a prevalência de resistência primária (3,6%), $P = 0,03$; RP 5,5 (95%IC 0,05-0,65). Neste estudo os dado estatístico demonstra que, nos pacientes MT/HIV tratados no HCPA, a ocorrência de TB polirresistente entre os pacientes previamente tratados é, aproximadamente, seis vezes maior àquela obtida entre os pacientes nunca tratados. Este dado corrobora a importância da realização do teste de suscetibilidade para os isolados

de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes tratados previamente com tuberculostáticos como preconiza o "Centers for Disease Control and Prevention" dos EUA (41).

Segundo a OMS (21), prevalências de MDR-TB primária superiores a 2% têm como principal causa a ineficácia do regime terapêutico empregado e a ineficiência dos programas locais de controle da TB. A prevalência de MDR-TB primária encontrada nos pacientes MT/HIV tratados no HCPA foi de apenas 1,2%, o que não representa, ainda, um problema adicional para o programa local de controle da TB. Cabe salientar que o 95%IC de 0,1 a 4,4 desta medida envolve valores superiores a 2% e que nesta mesma amostra a isoniazida apresentou uma prevalência de resistência primária de 7,3%. Estes achados nos reportam à necessidade de um contínuo monitoramento das taxas de prevalência de resistência do MT no nosso meio.

As prevalências de MDR-TB encontradas na amostra de pacientes HIV-positivos tratados no HCPA se parecem, estatisticamente, com as prevalências encontradas em pacientes tratados nos ambulatórios da rede pública de saúde do estado do Rio Grande do Sul (28) (Tabela 4). Este dado sugere que o simples fato do paciente ser HIV-positivo e tuberculoso não o predispõe a MDR-TB, corroborando os resultados do Projeto Global da WHO/IUATLD (21) que, embora não tenha estudado a associação entre TB e HIV, observou baixos índices de MDR-TB em países com altas taxas das duas infecções.

O teste laboratorial utilizado para a identificação do agente etiológico da TB neste estudo (o teste do NAP), não diferencia as micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*,

Mycobacterium africanum e o *Mycobacterium microti*). Portanto, as prevalências detectadas neste estudo devem ser creditadas ao conjunto das espécies do complexo *M. tuberculosis*. Não há relatos na literatura de micobacteriose causada por *M. africanum*. No entanto, Niemann e colaboradores encontraram o *M. microti* em dois casos de tuberculose pulmonar em pacientes HIV negativo (42) e suspeita-se de que alguns casos diagnosticados e notificados como TB, poderiam tratar-se de micobacterioses causadas pelo *M. bovis*, normalmente responsável por micobacterioses em bovinos. O *M. bovis* já foi inclusive identificado como o verdadeiro agente etiológico de alguns casos de MDR-TB de pacientes HIV-positivos em hospitais da Europa (43,44). Bolvet e colaboradores (43) encontraram uma cepa do *M. bovis* multirresistente, em cinco pacientes tratados em um hospital de Paris, demonstrando a possibilidade de transmissão, deste microorganismo entre humanos.

Uma característica genética do *M. bovis* é a resistência intrínseca à PZA. É importante ressaltar que, na amostra estudada, seis isolados bacterianos apresentaram resistência somente à PZA, e outros três apresentaram resistência à PZA combinados com outros fármacos. Testes adicionais não foram realizados para diferenciar o *M. bovis* do *M. tuberculosis*. Seria de interesse, portanto, estabelecer a prevalência da espécie *M. bovis* dentro do complexo *M. tuberculosis* para se determinar a possível tendência do aumento da resistência à PZA, bem como da polirresistência, devido à espécie *M. bovis*. No caso específico deste estudo, poder-se-ia determinar, entre os casos de resistência à PZA, a presença de *M. bovis* através de testes bioquímicos ou moleculares. Estes testes não foram realizados porque a baixa prevalência de resistência à PZA não justificaria mais este procedimento laboratorial.

O resultado deste estudo nos leva a concluir que a resistência do complexo *M. tuberculosis* aos cinco tuberculostáticos de primeira linha encontrada em pacientes co-infectados MT/HIV tratados no HCPA foi predominantemente adquirida. A isoniazida apresentou o maior índice de resistência (10%) e a resistência a este fármaco esteve presente entre todos os pacientes que apresentaram tuberculose polirresistente (5%). A rifampicina apresentou uma das menores taxa de resistência (1,7%) e não demonstrou índices de monorresistência. A prevalência de MDR-TB seja na forma primária (1,2%) ou adquirida (6,7%) é baixa nos pacientes HIV-positivos tratados no HCPA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hijjar MA. Plano emergencial para o controle da Tuberculose no Brasil. *Pulmão RJ* 1996;5:167-9.
2. Gerhardt Filho G, Hijjar MA. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. *J Pneumol* 1993;19:4-10.
3. Neville K, Bromberg A, Bromberg R, et al. The third epidemic multidrug-resistant tuberculosis. *Chest* 1994;105:45-8.
4. Rilley LW. Drug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1993;17 Suppl 2:442-6.
5. Kent JH. The epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis in the United States. *Med Clin North Am* 1993;77:1391-409.
6. Centers for Disease Control. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons - Florida and New York, 1988-1991. *MMWR* 1991;40:585-91.
7. Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos GL, et al. An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann Intern Med* 1992;117:177-83.
8. Edlin BR, Tokars JL, Grieco MH, et al. An outbreak of multidrug resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med* 1992;326:1514-21.
9. Frieden T, Sterling T, Pablos Méndez A, et al. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993; 328:521-6.

10. Coronado VG, Beck Sague CM, Hutton MD, et al. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1993;168:1052-5.
11. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al. Transmission of tuberculosis in New York City - An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiological methods. *N Eng J Med* 1994; 330:1710-6.
12. Monno L, Angarano G, Carbonara S, et al. Emergence of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-infected patients. *Lancet* 1991;337:852.
13. Bouvet E. Transmission nosocomiale de tuberculose multirésistante parmi les patients infectés par le VIH: en France, à Paris. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 1991;45:196-7.
14. Anonymous. Outbreak of hospital-acquired multidrug-resistant tuberculosis. *CDR* 1995;5.
15. Herrera D, Cano R, Godoy P, et al. Multidrug-resistant tuberculosis outbreak on an HIV ward - Madrid, Spain, 1991-1995. *MMWR* 1996;45:330-3.
16. Antunes ML, Aleixo-Dias J, Antunes AF, et al. Anti-tuberculosis drug resistance in Portugal. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4 Suppl 3:223-31.
17. Moro ML, Errante I, Infuso A, et al. Effectiveness of infection control measures in controlling a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among HIV patients in Italy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4 Suppl 1:61-8.
18. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA* 1996;276:1229-35.

19. Pablos-Méndez A, Sterling TR, Frieden TR. The relationship between delayed or incomplete treatment and all-cause mortality in-patients with tuberculosis. *JAMA* 1996;276:1223-8.
20. Rao KV, Iademaro EP, Fraser VJ, et al. The impact of comorbidity on mortality following in hospital diagnosis of tuberculosis. *Chest* 1998;114:1244-52.
21. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistant surveillance 1994-1997. WHO, Geneva, Switzerland, 1997. WHO/TB/97.229.
22. Fiuza De Melo FA, Ide Neto J, Seiscento M, et al. Tuberculose multirresistente. *J Pneumol* 1993;22:3-8.
23. Seiscento M, Fiuza De Melo FA, Ide Neto J, et al. Tuberculose multirresistente (TBMR): aspectos clínico-laboratoriais, epidemiológicos e terapêuticos. *J Pneumol* 1997;23 Supl 5:237-44.
24. Salen JI, Goh KS, Lataiff LRL, et al. An investigation of primary and acquired drug-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus (Amazonas, Brazil). *J Pneumol* 1990;16 Suppl 1:6-8.
25. Ferrazoli L, Palaci M, Marques RM, et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4 Suppl 1:18-25.
26. Silva EAM, Sato DN, Telles MAS, et al. Resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* from São Paulo State, Brazil, 1986 to 1990. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1992;52(1/2):37-40.
27. Chatkin JM, Bassanesi MC, Leiria BP, et al. Initial resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Rio Grande do Sul. *J Pneumol* 1981; 7 Suppl 4:199-202.

28. Jardim SBV, Ribeiro MO, Castro RM, et al. Anti-tuberculosis drug resistance in Rio Grande do Sul State, Brazil. Poster sessions/Global Congress on Lung Health 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 1998 Nov 23-26; Bangkok, Thailand. Poster N. ° 680PD.
29. Murray PB, Imore C, Krogstad DJ. The acid-fast stain: a specific and predictive test for Mycobacterial disease. *Ann Intern Med* 1980;92:512-3.
30. Centro de Referência Professor Hélio Fraga / Centro Nacional de Epidemiologia / Fundação Nacional da Saúde / Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2^o ed. Rio de Janeiro 1994. p. 27-33.
31. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta; 1985.
32. Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, et al. Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Cood. Ed., Weissfelf AS. Cumitech 16A. American Society for Microbiology, Washington; 1994.
33. Morgan MA. Evaluation of the p-nitro-a-amino-b-hidroxypropiofenone differential test for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1985;21:634-5.
34. Rastogi N, Goh KS, David HL. Drug susceptibility testing in tuberculosis: a comparison of the proportion method using Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 agar media and a radiometric method. *Rev Microbiol* 1989;140:405-17.
35. Siddiqi SH, Hawkins JE, Laszlo A. Interlaboratory drugs susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric procedure and two conventional methods. *J Clin Microbiol* 1985;22:919-23.

36. Tarrant JJ, Groschel DHM. Evaluation of the Bactec radiometric method for detection of 1% resistant population of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1985;21:941-6.
37. Salfinger M, Reller B, Demchuck B, et al. Rapid radiometric method for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Microbiol 1989;140:301-9.
38. Gutierrez RS, Ott WP, Picon PD. Métodos Diagnósticos. In: Picon PD, Rizzon CFC, Ott WP , editores. Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda; 1993. p. 491-587.
39. Jobim R, Wiederkehr P, Lopes R. A co-infecção tuberculose/HIV no município de Porto Alegre. Boletim Epidemiológico – Ano IV, nº 12, ago 2001.
40. Ott WP. Bases essenciais para controle da doença. In: Picon PD, Rizzon CFC, Ott WP, editores. Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda; 1993. p. 03-19.
41. Metchock B, Nolte FS, Wallace R. Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: ASM Press; 1999. p. 399-437.
42. Niemann S, Richter E, Dalügge-Tamm H, et al. Two cases of *Mycobacterium microti*-derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. CDC Vol. 6, nº 5 Sep-Oct 2000.
43. Bolvet E, Casalino E, Mendoza-Sassi G, et al. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. A caso-control study. AIDS 1993;7:1453-60.
44. Blázquez J, Espinosa de Los Monteros LE, Samper S, et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak Human Immunodeficiency Virus-positive patients. J Clin Microbiol 1997;35:1390-3.

Tabela 1. Composição da amostra estudada conforme materiais clínicos e histórico de tratamento prévio.

Materiais clínicos	Total de pacientes	N.º de pacientes não tratados (NT)	N.º de pacientes tratados(T)
Escarro	44 (24,4%)	39 (21,6%)	5 (2,8%)
Lavado bronco alveolar	54 (30%)	50 (27,8%)	4 (2,2%)
Linfonodo	36 (20%)	33 (18,3%)	3 (1,7%)
Líquido pleural	18 (10%)	15 (8,3%)	3 (1,7%)
Líquor	12 (6,6)	12 (6,6%)	0 (0%)
Abscesso e biópsia	9 (5%)	9 (5%)	0 (0%)
Medula óssea	3 (1,6%)	3 (1,6%)	0 (0%)
Outros (Liq. sinovial, fezes)	4 (2,2%)	4 (2,2%)	0 (0%)
Total	180 (100%)	165 (91,7%)	15 (8,3%)

Tabela 2. Positividade da pesquisa de BAAR (Zielh-Neelsen).

Espécimes clínicos	Total de pacientes estudados	N.º de pacientes com BAAR positivo	N.º de pacientes com BAAR negativo
Escarro	44 (24,4%)	23 (12,8%)	21 (11,7%)
Lavado bronco alveolar	54 (30%)	27 (15%)	27 (15%)
Linfonodo	36 (20%)	14 (7,8%)	22 (12,2%)
Líquido pleural	18 (10%)	0 (0%)	18 (10%)
Líquor	12 (6,6%)	3 (1,6%)	9 (5%)
Abscesso e Biópsias	9 (5%)	7 (3,9%)	2 (1,1%)
Medula óssea	3 (1,6%)	0 (0%)	3 (1,6%)
Outros (Liq. sinovial, fezes)	4 (2,2%)	0 (0%)	4 (2,2%)
TOTAL	180 (100%)	74 (41%)	106 (59%)

Tabela 3. Prevalência de resistência do complexo *M. tuberculosis* aos cinco fármacos testados.

	N.º pacientes estudados	N.º pacientes não tratados (NT)	N.º pacientes tratados (T)
Total de casos estudados	180 (100%)	165 (91,75%)	15 (8,3%)
Sensibilidade aos 5 fármacos testados	146 (81,1%)	138 (83,6%)	8 (53,3%)
Resistência		Primária	Adquirida
Resistência geral	34 (18,9%)	27 (16,4%)	7 (46,7%)
▪ Isoniazida (H)	18 (10%)	12 (7,3%)	6 (40%)
▪ Rifampicina (R)	3 (1,7%)	2 (1,2%)	1 (6,7%)
▪ Etambutol (E)	2 (1,1%)	2 (1,2%)	0 (0%)
▪ Estreptomicina (S)	14 (7,8%)	13 (7,8%)	1 (6,7%)
▪ Pirazinamida (PZA)	9 (5%)	7 (4,3%)	2 (13,3%)
Monorresistência*	25 (13,9%)	21 (12,7%)	4 (26,7%)
▪ Isoniazida (H)	9 (5%)	6 (3,6%)	3 (20%)
▪ Rifampicina (R)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
▪ Etambutol (E)	2 (1,1%)	2 (1,2%)	0 (0%)
▪ Estreptomicina (S)	8 (4,5%)	8 (4,9%)	0 (0%)
▪ Pirazinamida (PZA)	6 (3,3%)	5 (3%)	1 (6,7%)
Polirresistência**	9 (5%)	6 (3,6%)	3 (20%)
	95%IC 2,3-9,3		
MDR-TB ***	3 (1,7)	2 (1,2%)	1 (6,7%)
	95%IC 0,4-4,8	95%IC 0,1-4,4	95%IC 0,2-31,9
▪ H + R	2 (1,1%)	1 (0,6%)	1 (6,7%)
▪ H + R + S + PZA	1 (0,6%)	1 (0,6%)	0 (0%)
outras combinações			
▪ H + S	4 (2,2%)	3 (1,8%)	1 (6,7%)
▪ H + S + PZA	1 (0,6%)	1 (0,6%)	0 (0%)
▪ H + PZA	1 (0,6%)	0 (0%)	1 (6,7%)

* Monorresistência : resistência isolada de cada fármaco testado

** Polirresistência: resistência a mais de um tuberculostático.

*** MDR-TB: resistência conjunta à Isoniazida e Rifampicina, com ou sem outros fármacos adicionais

Tabela 4. Resistência do MT em pacientes HIV-positivos tratados do HCPA comparados com a resistência do MT em pacientes tratados na rede ambulatorial de saúde do estado do Rio Grande do Sul (28)

	MT/HIV HCPA	MT Rede ambulatorial	P	Razão de Prevalência	95% CI
Polirresistência*	9/180 (5%)	15/369 (4%)	0,78	1,23	0,55 - 2,76
▪ primária	6/165 (3,6%)	5/293 (1,7%)	0,21	2,1	0,7 - 6,9
▪ adquirida	3/15 (20%)	10/76 (13,2%)	0,44	1,5	0,5 - 4,9
MDR-TB**	3/180 (1,7%)	9/369 (2,4%)	0,76	0,68	0,19 - 2,49
▪ primária	2/165 (1,2%)	4/293 (1,4%)	1,0	0,9	0,16 - 4,8
▪ adquirida	1/15 (6,7%)	5/76 (6,6%)	1,0	1,3	0,2 - 10,4

* Polirresistência: resistência a mais de um tuberculostático.

** MDR-TB: resistência conjunta à Isoniazida e Rifampicina, com ou sem resistência a outros fármacos.

ANEXO 1

Aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós Graduação -HCPA.

Aprovação de Recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa – HCPA.

ANEXO 2

Resumo do Pôster apresentado na sessão de pôster do "4th International Conference of the Hospital Infection Society", Edimburgo (Escócia), 1998.