



JOSE MIGUEL CHATKIN

UM ESTUDO SOBRE RESISTÊNCIA INICIAL DO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM
MEDICINA - PNEUMOLOGIA
UFRGS

Dissertação de Mestrado para
o Curso de Pós-Graduação em
Pneumologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Dr. José A. Chaieb

Porto Alegre - 1980

A meus familiares, pelo incentivo
e carinho, dedico este trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
1 - INTRODUÇÃO	5
2 - LITERATURA	8
2.1 - Teorias da Origem da Resistência	8
2.2 - Modificações na Hipótese Mutacional de Resistência	10
2.3 - Genética da Fármaco-Resistência do <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i>	13
2.4 - Modelos de Resistência	16
2.5 - Bioquímica da Resistência	18
2.6 - Conceito de Resistência Bacilar em Tuberculose . .	19
2.7 - Avaliação Clínica	21
2.8 - O Estudo da Resistência Bacilar no Brasil	33
2.9 - Teste de Sensibilidade	36
3 - MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 - Seleção de Pacientes	47
3.2 - Protocolo	47
3.3 - Baciloscopia	48
3.3.1 - Colheita do material e preparação da lâmina .	48
3.3.2 - Microscopia	49
3.4 - Cultura	50
3.4.1 - Tratamento do escarro	50
3.4.2 - Semeadura	51
3.4.3 - Meio de cultura	51
3.4.4 - Controle do crescimento nos tubos	52
3.4.5 - Resultados das culturas	53
3.5 - Concentração e Proporção Críticas	54
3.6 - Preparação dos Meios de Cultura com Drogas	55
3.7 - Teste de Sensibilidade	56
3.8 - Prova da Niacina	57
3.8.1 - Procedimentos	57
3.8.2 - Resultados	58
3.8.3 - Interpretação	58

	Pág.
4 - RESULTADOS	59
5 - DISCUSSÃO	71
6 - CONCLUSÕES	77
7 - RESUMO	78
8 - SUMMARY	79
9 - BIBLIOGRAFIA	80

1 - INTRODUÇÃO

O presente trabalho visa a realizar um levantamento dos níveis de resistência inicial do *Mycobacterium tuberculosis* (BK) às principais drogas antituberculosas.

A relevância de tal informação prende-se ao desconhecimento de tais dados, de forma atualizada, em nossa comunidade.

Os estudos disponíveis datam de uma época em que a situação epidemiológica era bem distinta da atual, de um período em que o esquema medicamentoso empregado era outro e, principalmente, de um momento de incerteza ou desconhecimento das normas fundamentais para o sucesso terapêutico em tuberculose. Esses fatos conduzem à possibilidade de que a população microbiana de então talvez apresente diferenças da atualmente encontrada em nossos pacientes.

Paralelamente, a padronização da técnica dos testes de sensibilidade, com o estabelecimento de critérios bem definidos posteriores aos últimos levantamentos locais, exige uma revisão do comportamento da resistência inicial do BK em nosso Estado.

Por outro lado, têm sido demonstradas diferenças significativas nos índices de resistência bacilar em uma mesma nação, conforme o grupo ou a região estudada. Na França (23), no Canadá (26), nos EUA (13,35,73,121) e na Inglaterra (138), os imigrantes são os grupamentos humanos que mais alteram os níveis de resistência daqueles países. Para esclarecer essas di

ferenças, Kopanoff e colaboradores (73) sugerem pesquisas regionais, levando-se em consideração as peculiaridades de cada comunidade, em lugar de amplos levantamentos nacionais, onde essas distinções podem não ser detectadas.

As peculiaridades de formação da população do Rio Grande do Sul poderiam levar a padrões de resistência bacilar diferentes dos encontrados no resto do país, tornando talvez inadequado adotar como nossos os índices encontrados no Centro ou Norte do Brasil. As diferenças raciais, culturais e sócio-econômicas poderiam levar a um comportamento frente ao tratamento, por parte do doente, talvez distinto do de outras regiões do Brasil, quiçá conduzindo a uma seleção de cepas que, ao longo do tempo, poderia levar a uma população bacilar característica de nossa região.

Por outro lado, é indiscutível a contribuição que os testes forneceram ao conhecimento do BK e da quimioterapia da tuberculose. Nos dias atuais, quando se avaliam novas modalidades terapêuticas (tratamento intermitente e/ou encurtado), a análise do comportamento da resistência do bacilo em uma comunidade é fundamental não só na avaliação do sucesso do esquema, como no planejamento das drogas a serem utilizadas (42). Também é necessário um parâmetro para comparações futuras, quando se estudarão o impacto dessas inovações na resistência bacilar.

Igualmente tem sido motivo de preocupação, para alguns autores, a constatação de altos níveis de resistência a duas e três drogas, "in vitro", encontradas em certos levantamentos em países mais desenvolvidos, o que poderia pôr em risco toda a política regional de controle da tuberculose (105,121,128).

O custo, os problemas técnicos e, em consequência, a pouca confiabilidade dos resultados, além da dificuldade de interpretação dos dados levaram os pesquisadores a reposicionarem-se quanto à utilização dos testes de sensibilidade em tuberculose, como rotina. A esses fatores, somaram-se importantes ensaios clínicos que mostraram sua utilidade restrita em programas de massa e praticamente nula em tratamentos individualizados.

Essa nova posição e os fatos que levaram a esse novo enfoque serão analisados na secção seguinte, onde também serão tratados outros aspectos de resistência microbiana.

Esta dissertação resultou do esforço conjunto de várias pessoas e do apoio de instituições que, de várias maneiras, contribuíram para sua concretização. Entre elas, o meu a gradecimento especial:

ao Dr. José Andraos Chaieb, pelo estímulo constante, amizade e orientação científica segura;

ao Dr. Bilac Pacheco Leiria, pela ajuda criteriosa nas técnicas laboratoriais;

ã Dra. Maria Christina Bassanesi, pela colaboração incansável e ativa participação na realização dos testes;

ao Dr. Edgar Mário Wagner, pela orientação na área da Estatística;

ã Prof^a Maria do Horto Soares Motta, pela revisão da linguagem e padronização técnica do texto;

ã Srta. Terezinha Maziero, pelo paciencioso e metuoso trabalho de datilografia;

aos médicos, enfermeiras e demais funcionários dos Serviços de Tisiologia dos Centros de Saúde 1, 2 e 3 de Porto Alegre e de Novo Hamburgo, da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, pela desprendida colaboração;

ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Biciências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cuja direção permitiu a utilização de suas dependências para a realização deste trabalho;

ã Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo financiamento parcial do empreedimento.

2 - LITERATURA

2.1 - Teorias da Origem da Resistência

A possibilidade de controle das doenças infecciosas motivou um grande interesse pelo estudo dos antibióticos* logo após sua descoberta. Entretanto, a ocorrência da resistência bacteriana emergente do emprego indiscriminado das novas drogas levou ao desenvolvimento de outras linhas de investigação. O esforço em superar o problema através de novas drogas atuantes sobre os organismos resistentes não obteve o sucesso esperado. Constatou-se que, ao uso de um novo fármaco, se sucedia o aparecimento de cepas a ele resistentes que, pelo desenvolvimento de certos mecanismos, podiam se reproduzir em um meio considerado adverso.

A interpretação desse fenômeno deu origem a longa contravérsia, somente esclarecida, mais recentemente, com as contribuições da Biologia Molecular e Genética de Microrganismos. Duas teorias surgiram para explicar a origem dos clones resistentes: a da adaptação fenotípica e a da origem genética da resistência.

* Os termos antibiótico e quimioterápico serão usados como sinônimos já que, na prática, a distinção entre ambos perdeu significação; usar-se-á quimioterapia como expressão genérica e sinônimo de terapêutica antimicrobiana.

Os defensores da teoria adaptativa postulavam que as alterações na constituição das células sensíveis ocorriam como resposta a um estímulo fornecido pelo antibiótico. O aparecimento da resistência seria, portanto, sucessivo ao contato com a droga, mediado por uma ação do tipo indutivo, exercida pelo agente sobre a célula sensível, não havendo alterações em seu material genético. As novas propriedades manter-se-iam estáveis mesmo na ausência do antibiótico e se perpetuariam, por algumas gerações, via citoplasmática.

O número de células resistentes dependeria apenas da população bacteriana inicial, já que todos os germes presentes na cultura teriam a mesma probabilidade de adquirir resistência. Essa tese foi defendida por C.E.Hinshelwood (112).

Para a teoria da origem genética da resistência, as causas básicas da modificação do fenótipo de um organismo seriam as mutações, com as conseqüentes alterações de certas características da célula.

Entende-se por mutação, segundo Herskowitz (55), uma variação não programada do material genético e, por taxa de mutação, a frequência com que ocorre aquele fenômeno.

Ao conceito de mutação, apõe-se o de seleção, para formar a teoria de mutação-seleção.

A transformação de uma célula sensível em resistente ocorreria espontaneamente em uma população bacteriana, permitindo à unidade bacilar tornar-se invulnerável ao antibiótico através de sistemas citoquímicos especiais. Essa alteração precederia o contato com a droga, cujo papel seria exclusivamente o de agente seletor favorecendo os microrganismos resistentes em detrimento dos sensíveis (56). O caráter antibiótico-resistência apareceria mesmo na ausência da droga e manter-se-ia estável nas gerações seguintes, em um fenômeno chamado estabilidade da resistência. Pode ocorrer, entretanto, uma nova mutação de caráter supressor ou reverso, determinando a volta da sensibilidade do germe à droga considerada (4).

Segundo esta teoria, o número de germes resistentes deve ser muito pequeno, pois a mutação é um fenômeno raro. Somente através de cultura em meio com o antibiótico é que se pode obter um número maior de mutantes resistentes pela multiplicação celular e gradativa destruição dos germes sensíveis. Se a mutação for precoce, o número de estirpes resistentes presente na população final será elevado, sendo bem menor se a mutação for tardia. Assim, o número de cepas resistentes está relacionado ao momento de ocorrência da mutação na história natural de uma cultura.

A variabilidade no número de colônias resistentes dá o nome de teste de flutuação à técnica desenvolvida por Luria e Delbruck (78) que, juntamente com numerosos outros dados experimentais (4,102), fortaleceram consideravelmente a hipótese mutacional de resistência.

Frente às inúmeras evidências que favoreciam a teoria mutacional, os defensores da teoria adaptativa modificaram suas idéias iniciais e, reposicionando-se, passaram a considerar que as alterações mais relevantes, que ocorriam nos microrganismos, verificar-se-iam somente depois de fenômenos excepcionais, como a mutação, enquanto que os eventos mais comuns, de menor significação, explicar-se-iam pela adaptação fenotípica (4).

Novos fatos evidenciavam que nem tudo poderia ser explicado pela teoria da mutação-seleção clássica. Os fenômenos biológicos eram bem mais complexos do que os rígidos limites que as teorias poderiam abranger.

2.2 - Modificações na Hipótese Mutacional de Resistência

O isolamento de cepas resistentes a várias drogas, a partir de meados dos anos 50, a princípio no Japão e depois em todo o mundo (100), com frequência bem maior que a esperada, e a ocorrência de epidemias ocasionadas por germes multirresis

tentes mostraram que os conceitos de mutação-seleção não eram suficientes para explicar esses fenômenos, já que um dos alicerces da teoria genética era a convicção de que a probabilidade de uma bactéria se tornar resistente a um fármaco era da ordem de 1×10^{-6} a 1×10^{-8} , e de tornar-se resistente a dois antibióticos seria o seu produto, da ordem de 1×10^{-12} até 10^{-16} , ou seja, extremamente rara.

Paralelamente, em laboratório, não se conseguiam obter germes com resistência semelhante à do padrão obtido "in natura". Os estafilococos resistentes à penicilina produzidos sob ação de agentes mutagênicos, por exemplo, são diferentes dos obtidos "in vivo", pois, nos primeiros, não há a produção de penicilinase (100). Além disso, não se podiam selecionar "in vitro" mutantes multirresistentes a partir de bactérias sensíveis utilizando-se uma só droga, como ocorre "in vivo".

O esclarecimento começou a surgir com a descoberta de uma nova forma de hereditariedade, não cromossomial, que seria regida por um fator citoplasmático, a partir dos trabalhos de Ochiai e colaboradores (4,100), em 1959, e Akiba e colaboradores (4,100), em 1960. Esses fatores citoplasmáticos, geralmente condicionantes de multirresistência, foram denominados de fator R.

Essa herança não cromossomial ocorre através de duas classes de partículas de material genético: os episomas e os plasmídeos que, respectivamente, podem ou não ligar-se ao cromossoma bacteriano durante o ciclo celular (4). A origem desses determinantes não está ainda estabelecida, podendo provir de um fragmento do cromossoma da própria bactéria ou de outro microrganismo (4). Experimentalmente, os fatores R podem ser anulados ou inativados por substâncias como os corantes acridínicos e a novobiocina (82).

Os níveis de resistência condicionados pelos determinantes extracromossomiais variam com a droga, com o tipo de fator R e com o hospedeiro. Isso significa que um mesmo fator pode determinar resistências diferentes em vários momentos em decorrência das variações dos outros dois elementos, droga e hos

pedreiro. Outro aspecto a considerar é o somatório de efeitos existentes entre os determinantes cromossomiais e extracromossomiais, o que permite à bactéria sobreviver a altas doses de antibióticos (4,100).

Um germe pode se tornar resistente não só por alterações mutagênicas, mas também por transferência de informações genéticas a partir de uma bactéria já resistente, o que pode ocorrer tanto nos determinantes cromossomiais como extracromossomiais de resistência. Nos primeiros, a transmissibilidade do caráter se dá por conjugação (transferência de material através de um contato físico entre as duas bactérias), transdução (transferência de genes bacterianos através da intervenção de um fago) e transformação (semelhante à transdução, porém sem a concorrência do vírus). A transferência do material genético extracromossomiai pode ocorrer por conjugação ou transdução (112).

Os determinantes citoplasmáticos de resistência têm uma adicional importância clínica já que podem transformar uma bactéria sensível em multirresistente. A possibilidade de um germe não patogênico tornar-se agressivo também é real, já que a infecciosidade da resistência pode ocorrer entre espécies diferentes. Em geral, as mutações conferem um só tipo de resistência, com o que se evita a seleção dos mutantes com o uso de duas ou mais drogas. A resistência extracromossomial é, via de regra, múltipla, podendo comprometer todos os antibióticos úteis para uma determinada situação, mesmo que essas drogas sejam estruturalmente diferentes entre si e tenham diferentes mecanismos de ação. Por exemplo, determinados segmentos de ADN podem ser capazes de conferir resistência à ampicilina, gentamicina e furazolidona (100). Portanto, a infecciosidade da resistência extracromossomial, além de mais frequente, é, potencialmente, mais perigosa para o homem (4). Desse modo, qualquer mecanismo que altere a composição genética (mutação ou aquisição de fatores de resistência) pode tornar uma bactéria resistente.

Esses novos conhecimentos sobre resistência bacteriana podem ser encarados como um elo entre as teorias mutacional

e adaptativa, pois, além de manterem os conceitos clássicos da Genética, admitem a existência de fatores citoplasmáticos, idéia defendida pelos adeptos da adaptação fenotípica.

Com isso, pode-se avaliar a complexidade do fenômeno da resistência e o grau de dificuldade dos estudiosos em terem, naquela época, uma visão global sobre o assunto, já que alguns fatos são explicados por uma teoria, e outros, por outra.

2.3 - Genética da Fármaco-Resistência do *Mycobacterium tuberculosis*

A intimidade dos fenômenos da fármaco-resistência do *Mycobacterium tuberculosis* não tem sido muito estudada, e a literatura sobre a genética do bacilo tuberculoso não é abundante, apesar da importância do fenômeno na prática médica.

Sobre o assunto, Canetti (17) afirmava textualmente:

"... plenty of work is waiting for microbial geneticists in the field of tuberculosis ... and I do not venture to say that tuberculosis offers ... the same superb model as it does for the study of delayed hypersensitivity. But the possibilities are worth exploring".

Tsukamura (142), em 1961, em trabalho pioneiro, fez uma revisão do controle genético da resistência, em *Mycobacterium tuberculosis*, às principais drogas disponíveis: estreptomicina (SM), kanamicina (KM), viomicina (VM), isoniazida (INH) e ácido paraminossalicílico (PAS).

Mais recentemente, os avanços da Genética de Microrganismos alcançaram os estudos das micobactérias.

Alberghina(3) demonstrou determinantes extracromossomiais de resistência aos aminoglicosídeos, sugerindo um único plasmídeo para kanamicina, viomicina e neomicina e um locus separado para a estreptorresistência. Usando, posteriormente, corantes acridínicos, de ação eliminadora dos elementos extracromossomiais,

mossomiais, encontrou um controle extracromossomial também para o PAS, de locus distinto dos aminoglicosídeos. A absoluta falta de resposta aos corantes nos mutantes resistentes a hidrazida, e tambutoi e rifampicina sugeriu que os determinantes dessas resistências estivessem integrados no cromossoma bacteriano (2).

Jones (71) demonstrou a transferência, por transdução pelo fago D29, de fator R de *Mycobacterium smegmatis* a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. A transdução de um marcador foi também encontrada em *Mycobacterium phlei*, (50) reforçando a noção de controles extracromossomiais presentes no bacilo tuberculoso e em outras micobactérias.

A resistência bacteriana a uma droga decorre dos determinantes cromossomiais ou citoplasmáticos, isoladamente ou da conjugação de ambos. Assim, a SM-resistência determinada pelo fator R resulta da produção de uma enzima (estreptomicinase), enquanto que a decorrente do determinante cromossômico resulta da formação de ribossomas resistentes. Alguns germes poderão ser altamente resistentes pela associação dos dois mecanismos (4).

Sabe-se, também, que a resistência condicionada por fatores extracromossomiais é mais baixa, via de regra, que a condicionada por comandos cromossomiais (4).

Tsukamura (143), submetendo uma cepa resistente a seis aminoglicosídeos a altas temperaturas, determinou não só a perda da multirresistência como o surgimento da hidrazidorresistência, sem encontrar uma explicação plausível para o fenômeno.

Tsukamura e Mizuno (144) demonstraram vários tipos de mutantes multirresistentes isolados a partir de germes não expostos previamente às drogas, obtidos após uma única repicagem, isto é, em uma geração somente. Assim, a partir de uma única mutação, puderam obter bacilos resistentes a seis drogas. Demonstraram também que o mesmo comportamento fenotípico (em resistência) pode ser alcançado com qualquer um daqueles seis diferentes antibióticos. Desse modo, cepas resistentes a tuberoactinomicina N, viomicina R e capreomicina puderam ser obtidas com o

uso isolado de qualquer uma das drogas.

Todo mecanismo que altere a composição genética da bactéria pode interferir no fenômeno da resistência. A ação de agentes químicos, principalmente sobre os elementos extracromossomiais, está bem determinada. A interferência de agentes físicos na sensibilidade do bacilo tuberculoso a drogas está ainda sendo avaliada. Zack e colaboradores (154) estudando o efeito de irradiações em doses convencionais sobre o *Mycobacterium tuberculosis*, concluíram pela provável emergência de mutantes resistentes e diminuição de sua viabilidade.

Como já foi visto, um germe resistente a uma droga pode perder essa característica; esse fenômeno não ocorre com a SM, pois, "in vitro", esse caráter mantém-se por várias gerações (17). Este é um argumento para explicar a permanência, em alguns locais, de altos índices de resistência primária na população, isto é, os bacilos resistentes à estreptomina contaminam pessoas, conservando suas características de resistência. As linhagens resistentes à INH, por outro lado, apresentam menor condição de sobrevivência do que as sensíveis, em um meio que não contenha aquela droga. Desse modo, por mecanismos seletivos, a estirpe sensível terminará por sobrepujar a resistente (4).

As taxas de mutação para hidrazida, rifampicina, estreptomina e etambutol foram determinadas com maior aproximação por David (34) que, partindo dos trabalhos de Luria e Delbrück, encontrou, respectivamente, $2,56 \times 10^{-8}$, $2,5 \times 10^{-8}$, $2,95 \times 10^{-8}$ e 10^{-7} mutações por bactéria por geração.

Um outro conhecimento precisa ser invocado para uma compreensão mais ampla da resistência a drogas: são os modelos de resistência.

2.4 - Modelos de Resistência

O padrão de desenvolvimento da fármaco-resistência pode seguir dois modelos, identificados por Demerec (4) e por Pryson e Demerec (4,12) como modelo da estreptomicina ou de um só passo, e modelo da penicilina ou de múltiplos passos. Esses modelos puderam ser explicados, mais recentemente, através do envolvimento de um ou mais genes envolvidos no processo.

No primeiro caso, a mutação atingirá um único gene que determina o caráter resistência a qualquer concentração da droga, isto é, semeando-se microorganismos em qualquer concentração da droga, obtêm-se mutantes resistentes. Existe a possibilidade, no entanto, de vários loci mutarem determinando o mesmo caráter. Mitchison encontrou três níveis para a estreptomicina em *Mycobacterium tuberculosis* e também em *E. coli*.

Assim, as colônias de bactérias, inoculadas em um meio contendo antibiótico, revelam, depois de uma só passagem, um grau de resistência que independe da concentração da droga que selecionou os mutantes resistentes. Isso significa que a mutação em um único locus já confere resistência, ou seja, há o envolvimento de um só gene.

No segundo caso, cada passo significa o envolvimento de mais um gene responsável pelo caráter, levando ao encontro de bactérias de baixa resistência inicial até o aparecimento de altos graus de resistência, por sucessivas mutações. Desse modo, os mutantes resistentes da primeira cultura somente o serão à concentração da droga que os selecionaram. Uma nova cultura em meio que contenha uma concentração maior do mesmo antibiótico, levará também à seleção de mutantes a esta nova concentração. Repetindo-se esse passo várias vezes, poderão ser isolados germes resistentes a concentrações muito altas do antibiótico em questão.

No modelo da estreptomicina, podem ser enquadrados o PAS, isoniazida, rifampicina e eritromicina, ficando, no modelo da penicilina, o cloranfenicol e as tetraciclina.

Quanto ao comportamento do etambutol, sob este enfoque, alguns trabalhos mostram que não há aumento do nível inibitório da droga após várias repicagens, enquanto outros revelam aumento de resistência de até 100 vezes (140). Os trabalhos laboratoriais de Tsukamura (140) indicam um comportamento de passo único. Pyle (110), em 1966, inclinou-se por um padrão escalonado de surgimento de resistência. Recentemente, Macdonald e colaboradores (80) encontraram um desenvolvimento gradual, sendo que 50% dos bacilos altamente resistentes na sua casuística haviam demonstrado graus menores prévios de resistência.

Podem ocorrer variações dos dois modelos principais. O padrão tipo estreptomicina abrange as variantes facultativa e obrigatória. Na primeira, existem vários níveis de resistência, como a estreptomicina, que, segundo Mitchison (97), apresenta três tipos principais. O modelo de passo único obrigatório implica, por sua vez, a presença de somente um tipo de mutante resistente. A rifampicina é um bom exemplo (4).

Existem diferenças importantes entre as drogas na sua capacidade de selecionar mutantes resistentes e que nem sempre mostram o mesmo comportamento "in vivo" e "in vitro" (134).

A tendência atual é a de se relacionar cada droga com seu modelo de resistência, dando menor importância à espécie do germe, isto é, o padrão é característico da droga, guardando menor relação com a bactéria analisada (4).

Os conhecimentos atuais da Biologia Molecular e da Genética de Microrganismos podem ser aplicados aos modelos de resistência. Diferentes padrões fenotípicos podem estar associados a comportamento genético similar: etambutol e rifampicina. Um mesmo modelo de resistência, porém com origem diferente, também pode ocorrer: PAS nos plasmídeos e hidrazida nos cromossomas (ambos apresentam modelo de passo único).

2.5 - Bioquímica da Resistência

Uma bactéria torna-se resistente a uma droga por uma alteração genética, com a consequente modificação de algumas propriedades bioquímicas da célula.

São descritos vários mecanismos bioquímicos que confeririam à bactéria a farmacoresistência, sendo salientado que alguns ainda não foram identificados na prática, e outros, são muito raramente (112).

Os principais mecanismos bioquímicos da resistência são:

a) produção de uma enzima que inative a droga: o fenómeno geralmente ocorre por determinantes extracromossomiais, como a penicilinase, produzida pelos estafilococos;

b) modificação da enzima ou do receptor sobre o qual a droga age: o receptor é incapaz, então, de formar um complexo com o antibiótico, geralmente devido à mudança de um aminoácido na cadeia proteica;

c) modificação da permeabilidade celular: é o caso das tetraciclinas que, para serem acumuladas na bactéria, exigem um complexo e difícil mecanismo de transporte através da membrana;

d) aumento da produção de enzima inibida: ocorre uma produção maior das enzimas normalmente inibidas pela droga. É o caso da cicloserina;

e) produção de metabólitos antagonistas ao antibiótico: o exemplo são os compostos sulfamídicos;

f) utilização de linha metabólica alternativa: ainda sem comprovação prática;

g) diminuição da utilização de um metabólito cuja produção é inibida pelo antibiótico.

A intimidade das reacções químicas da resistência do BK aos antibióticos não é uniformemente conhecida, face às dificuldades técnicas de estudo.

A análise do metabolismo do bacilo tuberculoso é dificultada pelo seu comportamento diverso "in vivo" ou "in vitro" (134). Como exemplos, tem-se, no primeiro caso, a síntese de menores quantidades de gorduras, tornando os bacilos mais hidrofílicos que as estirpes cultivadas "in vitro"; também não contêm ácidos graxos com mais de 30 átomos de carbono. As micobactérias que crescem "in vitro" têm uma atividade maior da desidrogenase succínica e da degradação da glicose e ácido lático; os bacilos que crescem "in vivo" possuem melhor atividade metabólica na presença de glicerol.

Além disso, a resistência a um determinado antibiótico pode ser resultante de mecanismos diferentes para cada caso, dificultando ainda mais o estudo bioquímico do fenômeno.

Por outro lado, a coincidência de interferência em uma seqüência bioquímica por duas ou mais drogas, determinando a chamada resistência cruzada, tem sido um modo de estudo do complexo fenômeno da resistência bacteriana (144).

Um novo caminho para um melhor entendimento do bacilo tuberculoso é o dos isótopos radioativos, porém a experiência específica no campo ainda é pequena (72,81).

O metabolismo dos bacilos resistentes ainda permanece quase desconhecido, estando bem esclarecido para poucos tuberculostáticos.

2.6 - Conceito de Resistência Bacilar em Tuberculose

Toda espécie biológica possui mecanismos de defesa para sua sobrevivência. Para o *Mycobacterium tuberculosis*, o mecanismo de maior significação clínica é a resistência aos quimioterápicos antituberculosos.

Cavallo (112) sugere que o termo "resistência" seria mais corretamente aplicado para indicar um fenômeno ocorrido em uma cepa bacteriana pertencente a uma espécie caracteristicamen-

te sensível a uma determinada droga e que tenha adquirido condições de sobrevivência na presença do antibiótico, sem, contudo, perder as outras características de sua espécie. Se uma espécie bacteriana não é inibida por um determinado antibiótico, mesmo em concentrações elevadas, seria mais adequado catalogá-la como in sensível, em vez de resistente. É o que ocorre com a *Pseudomonas* sp. em relação à penicilina, por exemplo.

A resistência a uma droga pode ser definida em termos bacteriológicos ou clínicos (22). O critério clínico é impreciso, pois sofre influência de vários fatores, sendo o bacteriológico o mais frequentemente adotado.

Mitchison (22) conceituou resistência de uma estirpe a uma droga como um decréscimo na sensibilidade de tal grau que seja razoável supor que a cepa considerada seja diferente de uma selvagem que nunca tenha entrado em contato com a droga em ques tão.

A maioria dos autores endossou esta noção e, em um trabalho da Organização Mundial de Saúde (OMS), produzido por um grupo de peritos em resistência bacteriana, ela é transcrita textualmente.

Entretanto, uma distinção rígida entre sensibilidade e resistência é artificial, pois sempre ocorrerão níveis menores de resistência em que algum grau de resposta terapêutica pode ser esperada.

Na clínica fisiológica, existem duas situações bem distintas:

a) resistência primária: corresponde ao achado de populações bacilares resistentes em doentes que nunca receberam drogas antituberculosas, devendo-se ou à infecção que ocorreu a partir de um paciente cujos bacilos eliminados já são resistentes, ou à presença de germes naturalmente resistentes na população inicial;

b) resistência adquirida ou secundária: corresponde ao achado de populações bacilares resistentes em pacientes que já receberam tuberculostáticos.

Alguns autores (27) defendem a idéia de que a resistência possa ser somente conseqüente a um fenômeno natural no seio de uma população selvagem. Outros adotam posição diferente. Fox (43), por exemplo, ao comparar pacientes resistentes e sensíveis com as respectivas histórias de contato, demonstrou que os considerados resistentes, na maior parte das vezes, conheciam seu provável caso índice que, por sua vez, já usara tuberculostáticos, levando a considerar como provável a contaminação com bacilos já resistentes. Posteriormente, confirmou-se a semelhança dos padrões de resistência de um caso e de seus comunicantes e estabelecera-se as possíveis repercussões clínicas desses achados (124, 125, 127).

A resistência primária, entretanto, não pode ser considerada uma mera réplica da adquirida. Vários fatores interferem, como a virulência das linhagens resistentes e a instabilidade inerente a certos tipos de resistência, fazendo com que as expressões epidemiológicas de tais eventos sejam bem distintas, como será discutido posteriormente.

Devido à dificuldade de avaliação de possíveis tratamentos prévios e, como conseqüência, a classificação dos bacilos resistentes como primários ou adquiridos, Canetti e colaboradores (22) preferem adotar a denominação de resistência inicial, que inclui os casos de resistência primária propriamente dita e os de resistência adquirida encoberta.

A persistência bacteriana é outro mecanismo usado pelo BK para escapar à ação das drogas, quando, por redução do seu metabolismo, torna-se incapaz de sofrer divisão celular, não sendo, assim, agredido pelos fármacos.

2.7 - Avaliação Clínica

A quimioterapia da tuberculose teve início em 1944, com os trabalhos de Waksman (29), que isolou a estreptomicina de um espécime fúngico, obtido da garganta de uma galinha, identificado posteriormente como *Streptomyces griseus*. Seu ponto de partida foi a ocorrência do fenômeno da antibiose em níveis significativos em

tre bactérias e actinomicetos, fungos que produziam grande quantidade de substância inibidora do crescimento bacteriano de várias espécies. A princípio, o pesquisador valorizou pouco esse achado quanto à inibição do *Mycobacterium tuberculosis*, dedicando ao fato somente uma linha de sua publicação original (29). A seguir, Hinshaw e Feldman (38,57) demonstraram a ação daquela substância em tuberculose de cobaias e, logo após, na do homem.

Com o emprego da estreptomicina, verificou-se a existência da fármaco-resistência já nos primeiros ensaios terapêuticos, deixando entrever a limitação da quimioterapia naqueles moldes e a necessidade de investigar novas drogas. O medicamento introduzido a seguir foi o PAS (28,29,30).

No período 1940-1950, demonstrou-se que, numa coletividade microbiana aparentemente pura, poderia haver elementos bacterianos possuidores de características diferentes das do padrão. A demonstração cabal da heterogeneidade de uma cultura de bactérias foi feita por Hauduroy (53) com seu "separador de germes". Esses conceitos puderam ser estendidos ao BK, com a constatação de que a resistência de uma população bacilar poderia variar conforme o órgão de que provinham os bacilos, em um mesmo doente (6).

Canetti e Saens (19) demonstraram, a seguir, diferenças quanto à resistência de germes originários de um mesmo órgão (pulmão) em um mesmo doente, deixando poucas dúvidas sobre a heterogeneidade de uma população de *Mycobacterium tuberculosis*.

Um outro aspecto dessa heterogeneidade é a verificação, já na década de 60, de que, a partir de inóculos semelhantes, poder-se-iam obter números diferentes de colônias (9,22,114).

A análise quantitativa da resistência do BK às drogas, em nível laboratorial, para suporte dos trabalhos clínicos que estavam sendo realizados, foi sistematizada por Crofton e Mitchison (32). Os primeiros trabalhos sobre o fenômeno foram os de Vennessland, Ebert e Bloch (97) e os de Yegian e Vanderlind (97), estudando cepas de laboratório. Mitchison (97) cita também Pyle que analisou estirpes provenientes diretamente de pacientes.

Demonstrou-se, mais adiante, que lesões mais extensas, cavitárias, determinariam maiores possibilidades de ocorrência de populações resistentes. Os primeiros trabalhos com esse enfoque são os de Howard e Howlett (68,69), datados de 1949. Essa noção evoluiu, permitindo que Canetti (17), mais tarde, afirmasse textualmente: "Resistance is fundamentally a phenomenon linked to large initial bacillary populations".

Uma condição fundamental para o desenvolvimento de resistência é, pois, a riqueza da população bacilar inicial. Assim, em uma população bacteriana grande, pode haver elevado número de mutantes resistentes mesmo para altas concentrações de drogas. Se a população bacteriana for pequena, muito provavelmente não conterá mutantes resistentes (16).

A correlação entre emergência de resistência e número de bacilos foi também demonstrada em tuberculose murina (17).

Como já foi referido, determinaram-se posteriormente, para cada um dos tuberculostáticos, as taxas de mutação, a partir das quais se pode prever o número de mutantes na população em estudo (34).

Outros fatores a interferirem na emergência de mutantes e no grau de resistência seriam as condições intrafocais da lesão, a concentração sanguínea das drogas e sua capacidade de difusão para os tecidos e a influência do emprego da medicação isolada ou associada. Novos conhecimentos sobre os mecanismos e os fatores que influem na ação bactericida das drogas foram apresentados por Mitchison e Dickinson (99), na XXIV Conferência Mundial da União Internacional Contra a Tuberculose, em Bruxelas, em 1978.

Após a descoberta da estreptomycinorresistência, começaram a ser detectados casos com tais bacilos resistentes, diminuindo, com isso, as possibilidades de cura (96). Em 1948, o Conselho Britânico de Pesquisas encontrava, em um ensaio terapêutico, o surgimento de resistência desde os primeiros dias de tratamento até cerca de 5 meses após o início, com média de 45 dias (92).

Nessa época Youmans (152,153) e seu grupo trabalharam muito com a estreptorresistência, mostrando que ela poderia aumentar de 500 a 1000 vezes após o tratamento.

Os primeiros ensaios terapêuticos com a droga, face ao desenvolvimento de resistência, já indicavam a necessidade do surgimento de novos tuberculostáticos. Hoje, sabe-se que, após pouco tempo de tratamento, já há grande número de bacilos SM resistentes selecionados (92). Após 4 meses, 80% dos pacientes contêm tais bacilos, sendo que uma parcela não desprezível desses germes não é inibida mesmo por altas concentrações da droga como 1000 µg/ml (150).

Dizia-se que a ação isolada da estreptomina "in vivo" era bastante imperfeita, podendo ocorrer até sobrevivência de bacilos sensíveis ao tratamento pelo antibiótico. Esse fato se deveria à exigência de altas concentrações, nem sempre atingidas, para que ocorresse uma ação realmente efetiva sobre a bactéria, facilitando, com isso, a seleção de mutantes resistentes (44).

Face a isso e à constatação de que, também com a associação SM-PAS, surgiam mutantes resistentes (93), os pesquisadores continuavam à procura de uma droga melhor para o tratamento da tuberculose, expectativa grandemente atendida com a descoberta da ação tuberculostática da hidrazida.

A comprovação da resistência bacteriana à hidrazida, entretanto, não demorou a ser detectada (43,115,117). MacDermott (82) comenta que, no mesmo ano da introdução do uso de hidrazida em tuberculose, inúmeros laboratórios isolaram bacilos resistentes em culturas prévias ao tratamento, fazendo supor que, em breve, casos de fracasso terapêutico deveriam surgir. Contudo, ele afirma textualmente "... we were looking all that summer of 1952 for the syndrome of drug neutralization due to drug resistance but it never came". Verificou-se, posteriormente, que o tempo para que uma comunidade bacteriana passasse de predominantemente sensível a principalmente resistente à INH podia variar bastante de caso a caso, após o início do uso terapêutico da droga (150).

Constatou-se também, que a presença de resistência à INH "in vitro" não correspondia necessariamente a uma evolução desfavorável do caso, diferentemente do que ocorria com a SM. Em 1961, Devadatta (35) demonstrou uma reduzida, porém inquestionável resposta à isoniazida por parte dos bacilos a ela resistentes. Tripathy e colaboradores (139), em 1969, confirmaram esse fato.

Discutindo o significativo prognóstico da resistência primária à isoniazida à luz dos conhecimentos adquiridos da década de 60, Canetti e colaboradores (22), em 1969, afirmavam que uma proporção significativa dos pacientes com resistência primária mostrava, com o uso da droga, resposta bacteriológica e mesmo, algumas vezes, conversão do escarro.

A Genética de Microrganismos e a Biologia Molecular posteriormente explicaram essa constatação clínica através do fenômeno da mutação reversa ou mutação supressora e da instabilidade da resistência.

Essas cepas resistentes à hidrazida mostraram características diferentes das do padrão, pois não produziam catalase e apresentavam virulência diminuída para cobaio e rato, apesar de poderem lhes ocasionar doença letal (94,95).

Os dados de ordem clínica, anatomopatológica e bacteriológica adquiridos posteriormente parecem indicar que os bacilos INH-resistentes, apesar de seu menor poder patogênico, são capazes de determinar tuberculose progressiva fatal.

A demonstração de que a primo-infecção tuberculosa poderia ocorrer com bacilos hidrazidorresistentes, apesar da virulência atenuada, foi realizada na Europa e nos Estados Unidos no mesmo período, com os trabalhos de Chaves (EUA 1956-1967), Noufflard (França - 1956), Fox (GB - 1957), Prappier (Canadá - 1957), Meissner (Alemanha - 1958), Thibier (França - 1960), Dissmann (Austria - 1960), citados por Devadatta (35).

Vários trabalhos confirmaram a hipótese de infecção com bacilos resistentes também em crianças (124,125,126,127,128,

155). Steiner e colaboradores (124,125,126,127,128) passaram a preconizar o uso de quatro drogas para seus pacientes pediátricos, após levantamento de resistência primária em crianças, pois encontraram altos níveis de resistência, como até 12,3% de resistência à SM e 8,8% à INH. Cifras tão altas como essas só têm sido registradas em poucos trabalhos americanos, mesmo para adultos, como os de Schiffman (121) que refere até 19,6% de multirresistência. Fairshter (37) e Steiner (125) demonstraram a ineficácia da quimioprofilaxia com hidrazida em casos de pacientes infectados com germes resistentes.

A observação de que poderia ocorrer resistência primária em crianças foi ampliada com a constatação, em vários trabalhos, de que esse fenômeno é mais comum nos mais jovens (23,74,75). Canetti e colaboradores (23) explicaram o fato com os seguintes argumentos:

a) sendo o jovem mais susceptível à tuberculose, a maioria dos casos provém desse grupo, cuja patogenia é, via de regra, exógena e, portanto, com maiores probabilidades de infecção com cepas resistentes;

b) nos mais idosos, em menor número, a provável patogenia é via endógena e, tendo ocorrido a primo-infecção no período pré-quimioterapia, a probabilidade maior é a de ter sido por bacilos sensíveis.

A análise da resistência à hidrazida em alguns levantamentos mostrou que a resistência primária é nitidamente menor que a adquirida (17,23). A explicação seria a menor virulência dos bacilos INH-resistentes e conseqüente menor número de contaminações que resultaria em doença. Outra hipótese seria a queda dos níveis de resistência que ocorre após várias multiplicações do bacilo na ausência da droga. Desse modo, ao contaminar um paciente, os bacilos diminuiriam sua resistência, e a proporção de sensíveis aumentaria (23,98). Schmidt (122), infectando macacos com bacilos sabidamente resistentes à hidrazida e catalase negativos, pôde reisolar germes sensíveis naqueles hospedeiros, mostrando, em animais de laboratório, o que no

deria ocorrer na prática médica. Canetti (23) refere vários trabalhos em que foi demonstrado, "in vitro", uma seleção vantajosa para os bacilos sensíveis, explicando o seu ressurgimento.

A predominância da resistência primária à estreptomicina sobre a adquirida é relacionada ao uso inicialmente indiscriminado da droga. O emprego concomitante da hidrazida explicaria o baixo número de casos de resistência adquirida (17,23).

Em outra seção foi discutido o fenômeno da estabilidade da resistência, altamente significativa, pelo menos "in vitro", para a SM-resistência e que poderia ser outra a explicação para a manutenção, por várias gerações, dos níveis de resistência primária em uma comunidade. Por outro lado, a resistência à INH é considerada instável (4).

As drogas descobertas mais recentemente, apesar de isolarem mutantes resistentes, puderam ser melhor aproveitadas face ao uso generalizado de vários tuberculostáticos.

Radner (111) analisou os baixos índices de emergência de resistência à RMP encontrados por vários autores, ao passo que Stottmeier (130) demonstrou uma frequência crescente de bacilos RMP resistentes, colocando até em dúvida a utilidade da droga nos próximos anos, se permanecer o ritmo atual de crescimento do fenômeno.

A maioria dos autores, entretanto, tem encontrado níveis indubitavelmente baixos para EMB e RMP (101), sugerindo o bom uso dessas duas drogas na comunidade desde sua introdução em tisiologia (1,23,58,73).

O tempo de surgimento de mutantes resistentes à rifamicina durante o uso monoterápico da droga em tuberculose é de aproximadamente um mês (8). A semelhança dos níveis de resistência primária àquela droga, em países de uso indiscriminado em comparação com os de uso exclusivo em tisiologia, levou Acocella e colaboradores (1) a concluir pela não emergência de estirpes resistentes àquele medicamento em infecções não específicas, se o tempo de tratamento não exceder a duas semanas. Mitti (103) a

firma que, com o uso isolado da RMP, após 60 dias verificou-se que as culturas que persistem positivas, mostram-se altamente resistentes. Com o uso associado de outra droga, o tempo eleva-se para cinco meses. Quando a droga é usada para erradicação de meningococos em portadores sãos, pode ser encontrada RMP-resistência quando, posteriormente, em regime terapêutico, a droga for usada novamente, mesmo após períodos muito curtos, como 2 dias (150).

Os tuberculostáticos em geral possuem a propriedade de isolar mutantes resistentes em maior ou menor grau, diminuindo a possibilidade de cura. Em consequência, os tisiologistas passaram a usar antibiogramas, largamente a princípio, e com menos ênfase nos últimos anos, como tentativa de prevenir um eventual fracasso terapêutico.

Levantamentos de resistência primária começaram então a ser feitos em todo o mundo, e, desde cedo, não-se observou que a resistência primária aos tuberculostáticos nos países mais desenvolvidos era relativamente baixa e assim tem se mantido (23,36,67,73,121,130,131,132,145).

Essa constatação começou a ser observada nos Estados Unidos com os trabalhos do U.S. Public Health Service (USPHS) que, em 1964, publicou dados referentes a 12 anos de observação (145). Mais tarde, o mesmo serviço publica novos dados, encontrando níveis globais de resistência da ordem de 3,5%, porém de difícil comparação com valores prévios por ter usado método, critérios e população bem diferentes dos empregados em levantamentos prévios (36).

Hobby e colaboradores (58,59,60,61,62,63,64), estudando um segmento da população americana, os veteranos de guerra, encontraram uma certa estabilidade nos níveis de resistência ao longo dos anos.

Em 1978, o Center for Diseases Control, de Atlanta, publica um trabalho marcante sobre o assunto, pois, pela primeira vez, nos Estados Unidos, o levantamento de resistência englobou doentes provenientes de todo o país. Os índices de resistência global encontrados foram da ordem de 8,6%, porém com variações

de 3,4% a 18,7%. Essas marcadas diferenças mostraram a necessidade de levantamentos menores, tomando em consideração as peculiaridades de cada zona e a dificuldade de estabelecer um valor médio para cada país (73).

A importância de levantamentos regionais fica bem caracterizada com a situação do Hawaii, estado americano de maior prevalência de tuberculose e de maior índice de imigração de zonas onde a resistência bacilar é ainda um sério problema de saúde pública. Os picos dos níveis de resistência, medidos ao longo de 20 anos, coincidem com o afrouxamento das quotas de imigração e das exigências sanitárias para o ingresso no país (105). Nesses anos, os índices de resistência dessa região interfeririam significativamente nos valores continentais, podendo dar uma visão distorcida da realidade americana.

Nos Estados Unidos, altas cifras da resistência são encontradas em imigrantes, provindos de países subdesenvolvidos onde, em geral, o manejo da quimioterapia não é o mais adequado (13,31,73,105,113,121,128,149). Em 1975, entraram naquele país 150 portadores de tuberculose ativa, apesar de todo o rigor das autoridades sanitárias, além de um número não determinado de imigrantes ilegais (113). Demonstrou-se também, que, em tuberculosos imigrantes do oriente, 48% apresentavam bacilos resistentes (149).

A importância dos imigrantes em países onde há pouca tuberculose é tão grande, que a American Thoracic Society (113), em 1977, publicou normas para o manejo desses casos.

A situação na Europa parece também mostrar uma estabilização ou leve decréscimo dos níveis de resistência primária (67).

Na África, alguns fatos importantes puderam ser detectados com levantamentos da resistência primária. Na África Oriental, entre 1953-55, não foi observado nenhum caso de resistência primária às drogas convencionais, enquanto que, em 1957, a resistência à INH subia a 16%, tendendo a cair novamente em levantamento posterior. Em Gana, ocorreu fenômeno semelhante, mostran

do quão rapidamente podem ocorrer mudanças na epidemiologia da resistência bacilar (67), comprovando a idéia mais recente de que são necessários levantamentos periódicos e regionais de re sistência primária.

Importantes estudos foram feitos sobre o assunto na Índia, sendo notória a contribuição do Centro de Madras. Também em Hong Kong, com o auxílio do Conselho Britânico de Pesquisas Médicas, realizaram-se várias pesquisas em resistência do BK aos tuberculostáticos (67).

Reichman e colaboradores (113) referem-se à escassez de dados atualizados sobre a magnitude da infecção por bacilos resistentes em muitos países. Podem ser citados, contudo, alguns trabalhos feitos na década de 70, no México, por Herrera e colaboradores (54), no Chile, por Valenzuela (146), na Espanha, por Ayuella e colaboradores (7), nos Estados Unidos, por vários grupos como os de Kopanoff (73), Doster (36) e Hobby (64), no Canadá, por Cheung (26) e os vários trabalhos que estão sendo produzidos no mundo todo como parte de protocolos de investigação de tratamento de curta duração (42).

Anteriormente, Horne (67) revisara os levantamentos feitos nos Estados Unidos, Europa, África e Oriente até meados da década de 60.

Canetti e colaboradores (23) elaboraram uma listagem em que relacionam os principais levantamentos de resistência primária em vários países e que, face à sua relevância, serão reproduzidas aqui (Quadro I).

Apesar de não serem recentes, em sua maioria esses dados permitem que se comparem os níveis nacionais e regionais com os internacionais. Entretanto, existem importantes restrições para a comparação de vários trabalhos em resistência primária e que foram sumarizadas no Quadro II, adaptado de Horne (67).

QUADRO I

NÍVEIS INTERNACIONAIS DE RESISTÊNCIA PRIMÁRIA

País	Autor	Data	Período de Investigação	Nº de casos	Res. primária
Austrália	Howells	1962	1968	1150	3,8%
Grã Bretanha	Miller e cols.	1966	1963	896	4,1%
Canadá	Armstrong		1967/68	1000	4,4%
EUA	Pub. Health Service	1964	1961/62	2400	4,0%
EUA	Hobby e cols.	1964	1962/63	1204	7,9%
EUA	Hobby e cols.	1970	1965/69	3183	7,8%
Japão	TB Research Committee	1970	1966	1320	8,5%
França	Canetti e cols.	1972	1967/70	6495	9,7%
Finlândia	Selrros	1965	1960/63	723	10,2%
Itália	Nitti	1966		341	13,2%
Kenya	East African BMRC	1968	1964	632	14,7%
Argélia	Larbaouri	1971	1967/70	1071	14,8%
Hong Kong	Hong Kong/ BMRC	1964	1962	302	20,0%
Índia	In Med. Coun.	1969	1965/67	851	22,0%

Adaptado de CANETTI et alii. Tubercle, 53:57-83, June 1972.

QUADRO II

FATORES QUE INTERFEREM NA COMPARAÇÃO DE TRABALHOS
EM RESISTÊNCIA A DROGAS EM TUBERCULOSE

I BACTERIOLÓGICOS

meio: sólido/líquido

técnica: direta/indireta

período de incubação

concentração das drogas/critérios

método concentração absoluta

método razão resistência

método das proporções

significação dos baixos graus de resistência

micobactérias atípicas

diferenças laboratoriais

II SELEÇÃO DE PACIENTES

nacional/regional/local/grupos selecionados

resistência primária/adquirida

importância do interrogatório

adultos/crianças

Adaptado de HORNE, N.W. Tubercle, 50:2-12, Mar.1969.

Outro fato a considerar é o de que a infecção tuberculosa pode ficar dormente e só se manifestar muitos anos após o contato, com o que um número imprevisível de casos resistentes poderão aparecer muito tempo após o controle da doença em uma determinada comunidade. Assim, a incidência de resistência primária proporcionalmente tenderá a subir nessa área, uma vez que os casos de infecção recente serão mínimos. Horne (67) sugere que se relacione a resistência primária com a população total e não mais com o número de tuberculosos existentes na área, para que não se tenha uma falsa imagem da gravidade epidemiológica do problema.

2.8 - O Estudo da Resistência Bacilar no Brasil

Os testes de resistência aos tuberculostáticos passaram a ser realizados em nosso país, com regularidade, a partir de 1949, no Laboratório Central de Tuberculose (LCT), no Rio de Janeiro, e no Instituto Brasileiro para a Investigação da Tuberculose, na Bahia (44). Nos anos seguintes à introdução da quimioterapia no Brasil, foram realizados vários trabalhos em resistência microbiana, especialmente à estreptomina. Já havia, nesse período, uma recomendação dos órgãos centrais dos Programas de Tuberculose para que a SM fosse usada sob critérios bem definidos, para evitar-se a emergência de resistentes (44).

Em 1952, paralelamente ao que se fazia na Europa e nos Estados Unidos, Fraga, Magarão e Dauster (46) analisavam a influência do tipo de lesão pulmonar no aparecimento da resistência à estreptomina.

Em 1953, o LCT começou a trabalhar com testes de sensibilidade à hidrazida e, em 1957, ao PAS, ampliando a abrangência de seus estudos (120) e, a partir de 1958, a realizar os testes de modo sistemático (45).

O uso de concentrações mais adequadas de drogas, a adoção exclusiva do meio de Loewenstein-Jensen e o aprimoramento da técnica laboratorial nos anos seguintes (86) propiciaram a ex

periência e o conhecimento necessários para que, em 1960, o Brasil fosse incorporado à Primeira Experiência Internacional de Quimioterapia (120). O trabalho aqui realizado já havia sido reconhecido, com a inclusão de dados enviados por Ibiapina e Magarão, nos levantamentos de Rist e Crofton (116) e de Stewart e Crofton (129). Também forneceram importantes subsídios para a adequação de critérios para o uso, em escala internacional, dos testes de sensibilidade (67).

O conceito de que os nossos meios especializados gozavam internacionalmente, entretanto, não condizia com a grave situação epidemiológica verificada no Brasil (48,88,148).

Em 1959, no LCT (45,88), constatou-se que cerca de dois terços dos tuberculosos possuíam bacilos resistentes a 2 ou 3 drogas. Poppe de Figueiredo e Garangan (107), em 1961, encontraram apenas 24,3% dos doentes admitidos no sanatório como sensíveis a SM, INH e PAS e estimaram a resistência primária em torno de 10 a 20%. Nessa ocasião, os índices oficiais de cura eram de cerca de 25% (120).

Em 1961, na XVI Conferência Internacional de Tuberculose, realizada em Toronto, Fraga e colaboradores (47) apresentaram, no exterior, um dos primeiros levantamentos de resistência bacilar feitos no Brasil.

O método das proporções de Canetti, Rist e Grosset (20) foi utilizado pelo LCT no mesmo ano de sua apresentação, o que permitiu a participação brasileira na Segunda Experiência Internacional de Quimioterapia (120).

A partir do Simpósio de Quimioterapia de Tuberculose realizado em 1965, em São Paulo, o método das proporções foi recomendado por unanimidade como a técnica a ser empregada nos laboratórios de todo o Brasil (118).

As pesquisas sobre resistência primária desenvolvem-se principalmente em quatro centros: São Paulo, Bahia, Pernambuco e Rio de Janeiro (em dois laboratórios). Alguns índices encontrados nesse período podem ser vistos no Quadro III.

QUADRO III
RESISTÊNCIA PRIMÁRIA NO BRASIL - ANOS 60

Região	Autor	Período	Índice	Referência
R. Janeiro	Magarão	1960	16,0%	84
São Paulo	Rosemberg	1962/66	20,5%	118
R. Janeiro	P.Figueiredo	1963/64	18,7%	108
Bahia	Silveira	1963/65	16,7%	118
Pernambuco	Magalhães	1964	14,1%	83
R. Janeiro	Magarão	1966	10,3%	87

No Rio Grande do Sul, May Pereira (104) observou resistência a uma ou mais drogas da ordem de 29,6%, enquanto que Chaieb, Tigre e Scliar (24) encontraram, no Hospital Sanatório Partenon, da Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul, resistência primária de 21,6% a uma droga e de 5,5% a duas drogas. Leiria (75), no Hospital Sanatório Belém, também encontrou altas cifras de resistência bacilar em Porto Alegre.

A tendência mundial de restringir os testes de sensibilidade a programas de saúde pública, com indicações muito precisas em casos individuais, encontrou ressonância no Brasil e, desde 1966, alguns autores começaram a adotá-la, entre eles Poppe de Figueiredo e Gerhardt Filho (106,108).

Em 1970, foi criada a Comissão de Bacteriologia e, no mesmo ano, a OMS enviou um técnico para organizar uma rede de laboratórios em todo o país como sustentação de um Programa de Controle de Tuberculosos (119). A partir daí, a ênfase dos trabalhos deslocou-se dos testes de resistência para a baciloscopia simples como técnica de maior rendimento em saúde pública. Alguns levantamentos, entretanto, ainda foram feitos.

Em 1975, Tavares de Lima Filho (136), em São Paulo, encontra as seguintes cifras de resistência primária: SM:10,5%; INH: 9,7%; PAS: 2,2%; EMB e RMP: 0,0%.

Em 1980, o mesmo autor (77) publica a experiência de 6 anos do Instituto Clemente Ferreira de São Paulo, em um levantamento que abrange oito estados.

Não há dados seguros para se avaliar a evolução da frequência da resistência primária em todo o Brasil. Existem informações sobre algumas regiões do país, em determinados períodos, com o que se pode ter a impressão de uma leve tendência regressiva (77,85,118). Sobre a resistência em geral, Maqarão e colaboradores (85,87) demonstraram essa tendência regressiva após doze anos de observações consecutivas na cidade do Rio de Janeiro (vide Tabela I transcrita de Maqarão e colaboradores (85).Pg.37.

2.9 - Teste de Sensibilidade

O surgimento da resistência bacilar levou à elaboração de um antibiograma especificamente destinado ao *Mycobacterium tuberculosis* e, progressivamente, foram sendo estabelecidos critérios bem determinados quanto ao meio de cultura, às doses de antibióticos e aos níveis de crescimento microbiano.

Os principais métodos usados foram o das concentrações absolutas, o da razão de resistência e o das proporções (9). A primeira técnica trabalhava com concentrações inibitórias mínimas (CIM), enquanto que a da razão de resistência fazia sua análise através da concentração inibitória mínima dos bacilos do paciente, relacionando-a com a de um padrão. O método das proporções será discutido na seção de Material e Métodos.

Existem duas possibilidades para a realização da cultura: a direta e a indireta: a primeira, executada quando a baciloscopia revela abundância de germes, usa diretamente o escarro do

TABELA I

Distribuição de casos de tuberculose não tratados
segundo a resistência primária do *M. Tubercu*
losis às drogas padrão

Rio de Janeiro - GB - Brasil - 1960/72

ANOS	CASOS NÃO TRATADOS	SENSÍVEIS ÀS 3 DROGAS		RESISTENTES PELO MENOS A 1 DROGA	
		Nº	%	Nº	%
1960/61...	568	509	89,6	59	10,4
1962/63...	1.087	45	86,9	142	13,1
1964/65...	1.768	1.578	89,3	190	10,7
1966/67...	1.370	1.245	90,9	125	9,1
1968/69...	1.246	1.131	90,8	115	8,1
1970/71...	1.745	1.606	92,0	139	8,0
1972.....	980	905	92,4	5	7,6
Total.....	8.764	7.919	90,4	845	9,6

Adaptado de Magarão, M.F. et alii. O Complexo Mycobacterium tu
berculosis. Rio de Janeiro, Fundação Atauilpho de Paiva, 1980.

doente; a variante indireta é utilizada quando há reduzido número de germes à baciloscopia, realizando-se um cultivo prévio do material antes de submetê-lo ao teste de sensibilidade (90).

A princípio, os inúmeros métodos empregados e a multiplicidade de interpretações dos resultados levaram a erros e a difíceis comparações entre as comunidades. Em 1960, em seu sétimo relatório, a OMS concluía pela necessidade de adoção de padrões internacionalmente aceitos, cujo estabelecimento deveria ser liderado por aquela própria organização (21).

Na década de 50, Canetti (14,15) já salientava as diferenças dos critérios de resistência usados pela Union Against TBC (UIAT), Veterans Administration (VAAF), British Council (BMRC) e pelo U.S. Public Health Service (USPHS).

Um grupo de técnicos da OMS estabeleceu, então, em 1963, padrões bem definidos para a realização dos testes de sensibilidade e, discutindo as dificuldades de padronização, enfatizou a necessidade da adoção de critérios regionais (21). É conveniente, portanto, que cada país ou região estude uma amostragem de cepas para saber em que proporção se encontram os mutantes resistentes aos diferentes antibióticos naquela comunidade.

Discutia-se também, a esse tempo, o nível a partir do qual haveria correspondência clínico-laboratorial. Além disso, a calibração dos testes para cepas presumivelmente sensíveis precisava ser aperfeiçoada, pois a população primariamente resistente e que influiria decisivamente nos resultados, era definida arbitrariamente.

Um sinal evidente desse problema encontra-se em um relatório do USPHS, de 1964, sobre prevalência de resistência primária, cujo critério para definição de resistência foi "... an arbitrary decision, based on little more than common practice and a preliminary examination of the correlation between the emergence of drug resistance organisms and clinical response" (145).

A validade dos testes era também questionada, já que poderia ocorrer melhora clínica com drogas consideradas ineficazes pelos testes de sensibilidade.

Stewart e Crofton (129) afirmavam, nesse período, que nenhum método de avaliação da sensibilidade e seus resultados poderiam ser considerados absolutos, a menos que houvesse correlação com os achados clínicos.

Em 1968, em uma nova reunião de técnicos em resistência bacteriana, da OMS, realizada na Suíça, foi definida resistência bacteriana, considerando-a do ponto de vista microbiano, já que, a partir do enfoque clínico, seria de precisão difícil, pois dependeria do esquema empregado, do metabolismo da droga e de fatores ligados diretamente ao paciente (22).

Nesse mesmo trabalho da OMS, pode-se notar a cautela com que foi feita a correlação clínico-laboratorial dos testes de resistência: "For most antituberculous drugs there is evidence that a diminished clinical response may occur when resistance in the above mentioned bacteriological sense is demonstrated in laboratory".

Começava-se a cogitar da dispensa dos testes de sensibilidade no início do tratamento, já que uma anamnese bem conduzida sobre quimioterapias prévias poderia indicar prováveis resistências.

W.Fox (39), em 1968, na primeira John Barnwell Lecture, punha em dúvida a validade dos testes de sensibilidade em primo-tratamento. Seus argumentos eram que, segundo levantamentos de resistência primária do bacilo tuberculoso na Grã-Bretanha, levados a efeito, em 1955-56 e 1963, pelo BMRC, os níveis de resistência mantinham-se estáveis e baixos. Admitia, com isso, que cerca de 95% dos pacientes com uso de esquema triplice, independentemente do teste, deveriam ficar curados; os restantes 5% resistentes também deveriam evoluir bem pelo uso das outras duas drogas potencialmente úteis, além de um certo grau remanescente de eficácia do medicamento, mesmo na presença da resistên

cia. Desse modo, somente cerca de 1% dos pacientes diagnosticados na Grã-Bretanha não obteria resposta terapêutica aos esquemas de várias drogas, prescritos sem a orientação do teste de sensibilidade.

Em 1969, Poppe de Figueiredo (106) encontrou cifras animadoras de conversão de escarro, desde que os pacientes usassem regularmente as drogas, mesmo sem considerar as prováveis resistências de cada cepa.

A questão ficou definida com um trabalho realizado em Hong Kong, patrocinado pelo BMRC, que demonstrou serem muito limitados os benefícios dos testes de sensibilidade como orientadores do esquema terapêutico, mesmo em regiões com altos índices de resistência primária (65,66).

As dificuldades técnicas para a realização dos testes são enormes, e existem evidências de que os resultados nem sempre são confiáveis. Wallace Fox (40) cita uma avaliação feita em 1969 por Wichelhausen e Robinson, nos laboratórios dos Veterans Administration Hospitals dos Estados Unidos, conhecidos pelos seus altos níveis de qualidade. Dos 43 laboratórios estudados em comparação com um de referência, a consistência dos resultados somente em 23 foi considerada boa, em 9, adequada e, em 11, má. Discordâncias significativas foram encontradas também na Grã-Bretanha, mostrando ser esse um fato de ocorrência comum, mesmo em países mais desenvolvidos (39). O grupo de peritos da OMS citado anteriormente chama atenção para o eventual malefício da realização de testes com pouca confiabilidade (22). Nesse mesmo ano, Horne (67) faz uma revisão sobre a resistência bacilar, listando as dificuldades maiores para o uso dos testes e para a comparação dos resultados dos diversos levantamentos. Entre elas, destacou a freqüente impossibilidade de determinar acuradamente a existência ou não de quimioterapia prévia, preferindo, como Canetti e colaboradores (22), usar o termo resistência inicial para qualificar a resistência encontrada, quando a informação não é plenamente segura. Alertou também para as diferenças entre as populações estudadas como outro fator a dificultar as

comparações entre os ensaios, além dos fatores bacteriológicos e técnicos, já citados em outra secção.

Nenhum dos testes de sensibilidade até agora conhecidos reúne as condições ideais de técnica fácil, resposta rápida e confiabilidade dos resultados. Isso ocorre pelas dificuldades de padronização do método, conseqüentes a variações amplas na atividade antimicrobiana das drogas em função do método de esterilização, da estocagem ou do meio de cultura utilizado. Essas variações podem ser vistas nas tabelas II e III, adaptadas de Vestal (147):

TABELA II

Porcentagem de droga ativa após uso de autoclave,
de filtros ou de congelação

DROGA (10.000µg/ml)	MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO			ESTOCAGEM A -20°C		
	Autoclave	Vidro	Milipore	3meses	5meses	6meses
INH	90	100	90	98	98	97
SM	90	95	95	95	92	90
PAS	100	100	100	85	80	75
EMB	98	88	90	90	90	90
RMP	Não testado	Não testado	100	91	86	-

Adaptado de Vestal, A.L. Procedure for the isolation and identification of mycobacteria. Dept. of Health, Education and Welfare, 1978.

TABELA III

Variação da concentração inibitória mínima
das drogas conforme o meio utilizado

DROGA	MEIO	
	7H - 10 ($\mu\text{g/ml}$)	Lowenstein ($\mu\text{g/ml}$)
INH	0,05 - 1,5	0,05 - 1,5
SM	1,0 - 2,0	1,0 - 5,0
PAS	1,0 - 2,0	0,25 - 0,5
EMB	2,0 - 6,0	2,60 - 6,0
RMP	0,05 - 0,2	2,5 - 5,0

Adaptado de Vestal, A.L. Procedure for the isolation and identification of mycobacteria. Dept. of Health, Education and Welfare, 1978.

A interferência do meio de cultura na atividade antimicrobiana já havia sido referida por Grosset e Canetti (52) ao analisarem a SM e dihidro SM.

Existem referências também quanto à inativação do EMB pelo meio empregado, influenciando decisivamente na análise dos resultados (49).

Outra dificuldade é a variação do número de bacilos existentes em 1ml de massa bacilar, que pode ir de 1 milhão a 100 milhões de germes. Usando duas diluições (10^{-3} e 10^{-5}), disperse-se, sempre de um número adequado de bacilos para o teste (114).

Também o preparo dos meios de cultura, com conseqüentes variações em sua fertilidade e especificidade, pode interferir nos resultados. Dados da OMS demonstraram que a vidraria, o coagulador, o tipo de material orgânico empregado e os agentes des

contaminantes podem influir decisivamente (91,133,134,135).

A desuniformidade de uma população bacteriana é um fator importante, pois, se forem eleitas amostras pouco representativas do conjunto, o resultado poderá não ser fidedigno. A adequação do tamanho do inóculo é o fator de correção.

Uma possibilidade de simplificação e standardização foi elaborada por Kertcher (72) usando método radiométrico para os testes de sensibilidade. Foi encontrada uma boa correlação entre o novo método e o tradicional, tanto para os bacilos sensíveis como para os resistentes, para isoniazida e estreptomicina. As vantagens do método, que data de 1974, seriam sua rapidez e possibilidade de análise quantitativa do fenômeno. O aperfeiçoamento da técnica permitiu a McDaniel (81) afirmar, em 1977, que esta inovação em breve poderia ser introduzida na prática diária dos tisiologistas.

As restrições às avaliações de sensibilidade aos tuberculostáticos, entretanto, não são devidas apenas às dificuldades inerentes ao próprio teste. Inúmeros outros fatores podem interferir relacionados com o hospedeiro ou com a droga, levando a uma resposta clínica diferente da prevista pelo teste de sensibilidade.

As variações individuais dos pacientes, como as que existem na velocidade de acetilação da INH, são um bom exemplo. Um bacilo pode ser resistente em um acetilador rápido e não em um lento, que possui a droga em circulação por mais tempo.

Também podem ocorrer más interpretações dos testes como julgamento inadequado de uma aparente melhoria dos resultados das baciloscopias, com o que drogas consideradas ineficazes "in vitro" podem simular uma resposta inicial favorável, antes da deterioração final do paciente. A eliminação esporádica, isolada de bacilos, na vigência de uma evolução favorável, pode ser confundida com fracasso terapêutico. Outra causa de erro é a valorização inadequada dos resultados de um teste, considerando

como sensíveis cepas que apresentam nadrões baixos de resistência, mesmo que acima das proporções críticas. Também a noção de que os resultados são absolutos não é a mais prudente, pois a detecção de resistência não significa que o paciente não se beneficiará com o uso da droga, mas, sim, que suas possibilidades de sucesso já não são plenas.

A classificação errônea de uma cepa sensível como resistente poderá conduzir a uma desnecessária troca de esquema terapêutico, com todas as conseqüências em custo e toxicidade, inclusive determinando, até pouco tempo, internamento compulsório do paciente por um longo período.

W. Fox (40), sumarizando as causas dos fracassos terapêuticos em tuberculose, lista os itens mais significativos, afirmando que a resistência bacteriana é o menos importante deles:

- a) prescrição inadequada de drogas por parte do médico;
- b) irregularidade na ingestão de drogas;
- c) abandono de tratamento;
- d) resistência primária do bacilo tuberculoso.

Grosset (51) acrescenta a esses fatores o retardo no diagnóstico, o que causou, em seus pacientes, até 2,2% de óbitos no primeiro ano de tratamento.

O próprio Fox (41), em 1977, afirma que o primo-tratamento deveria ser realizado à luz de informações sobre as características do bacilo numa comunidade, desconsiderando-se a resistência inicial de cada caso em particular. Também julga desnecessária, e até mesmo prejudicial, a realização dos testes durante o tratamento, por uma eventual má interpretação de resultados, como nos casos de resistência transitória. Relega o papel dos testes, sendo a técnica confiável, à seleção de regimes terapêuticos para retratamento de pacientes nos casos de fracasso.

Nos esquemas de curta duração ou intermitentes, o papel dos testes de sensibilidade não parece ser maior. Se os ní

veis de resistência primária são baixos, como nos países desenvolvidos, é racional e operacionalmente mais simples ignorá-los e tratar todos os pacientes do mesmo modo. Havendo fracasso, existe a possibilidade de retratá-los com os esquemas convencionais. Nas áreas de altos níveis de resistência inicial, o importante será o desenvolvimento de esquemas efetivos para a comunidade e eventualmente para um caso individualizado (41).

Sobre o papel dos testes de sensibilidade nos dias de hoje, Grosset (51) afirma que para melhorar os resultados do tratamento da tuberculose, é necessário dar prioridade não à realização de antibiogramas, mas ao diagnóstico e tratamento dos doentes, assegurando a administração regular de um esquema padronizado, no mínimo, a todos os bacilíferos.

Os trabalhos apresentados na XXIV Conferência Mundial da União Internacional contra a Tuberculose, em Bruxelas, sugerem que os regimes encurtados, de fase inicial intensiva com as quatro drogas principais - RMP, INH, SM e PZA - seguidos de uma fase que contenha RMP, podem vencer amplamente a resistência inicial a drogas. Nesse mesmo congresso, foi enfatizada a importância do conhecimento da resistência primária na seleção dos esquemas a serem utilizados em uma determinada coletividade(42).

Johnston e Mildrick (70), comentando críticas recebidas a uma publicação sua, afirmam com o que parece ser a posição dos tisiologistas nos dias atuais: "We contend that in most instances drug susceptibility studies are unnecessary in the initial treatment of pulmonary tuberculosis. If performed...drug regimen should be altered only if clinical radiologic or bacteriologic data indicate that therapy has been ineffective".

A maior utilidade dos testes, nos dias atuais, fica restrita a levantamentos em programas de saúde pública, com a análise da evolução da resistência bacilar na comunidade, ao longo dos anos. Além disso, serve como guia na escolha dos esquemas terapêuticos a serem adotados em programas de massa. Do ponto de vista epidemiológico, interessa avaliar essas taxas de resistên

cia periodicamente, para que se estimem os riscos de transmissão dos bacilos resistentes (89).

Para casos individualizados, a utilização dos testes restringe-se a casos de fracasso terapêutico, para a escolha de um derradeiro esquema de drogas.

As indicações dos testes de sensibilidade são as seguintes (79,151):

a) pacientes bacilíferos com quimioterapia prévia (recaída ou retratamento)

b) pacientes em tratamento, que, após negatificação do escarro, repositivarem

c) pacientes cujo escarro não negativar após dois ou três meses de tratamento

d) pacientes cujas culturas de escarro não negativarem em quatro a seis meses de tratamento

e) pacientes com crescente baciloscopia após um decrêsimo inicial

f) pacientes com outra micobacteriose

g) pacientes suspeitos de resistência primária

Não há indicação para pacientes não tratados previamente, como rotina.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Seleção de Pacientes

A seleção dos pacientes para estudo de resistência inicial aos tuberculostáticos foi realizada dentre os que procuraram, espontaneamente ou por encaminhamento, os Serviços de Tisiologia da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, localizados nos Centros de Saúde 1, 2 e 3, de Porto Alegre, e no de Novo Hamburgo, no período de setembro de 1978 a setembro de 1979.

Os doentes bacilíferos diagnosticados pela Pede de Baciloscopia da Secretaria da Saúde eram entrevistados por um tisiologista e por uma enfermeira especializada e, se houvesse uma boa margem de segurança quanto às informações do não uso prévio de tuberculostáticos, eram admitidos no protocolo de estudo.

3.2 - Protocolo

Os critérios para ingresso no protocolo estão reunidos no Quadro IV.

Aos bacilíferos, sem tratamento prévio, solicitava-se nova amostra de escarro, agora para processamento no laboratório do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

QUADRO IV

CRITÉRIOS PARA INGRESSO NO PROTOCOLO

Pacientes:

- com baciloscopia de escarro positiva
- maiores de 15 anos
- virgens de tratamento
- com condições clínicas passíveis de tratamento ambulatorial
- com confirmação das informações por médico e enfermeira especializados

Paralelamente à confirmação baciloscópica pelo achado de bacilos álcool-ácido resistentes, realizava-se a cultura do material.

Quando da identificação de colônias de *Mycobacterium tuberculosis* pelos critérios morfológicos, tempo de crescimento e prova da niacina, procedia-se ao teste de sensibilidade aos tuberculostáticos, pelo método das proporções de Canetti, Rist e Grosset (20).

3.3 - Baciloscopia

3.3.1 - Colheita do material e preparação da lâmina

O escarro colhido era a primeira amostra da manhã, por ser a que permite crescimento mais rápido do bacilo com menor índice de contaminação (151). Realizava-se esfregaço para colocação pela técnica de Ziehl-Neelsen:

I - esfregação em lâminas novas, previamente desengordu radas, com material escolhido da porção mais densa do escarro

II - secagem em temperatura ambiente

III - fixação pelo calor

IV - coloração pela fucsina fenicada, a quente, até o aparecimento de vapores, quando se suspende o aquecimento. Após um breve esfriamento, reaquece-se, repetindo-se o processo por 3 a 5 minutos

V - lavagem em água corrente

VI - descoloramento pelo álcool-ácido (solução de álcool etílico 95^oC - 97 ml e ácido clorídrico 3 ml), até que as zonas mais espessas do esfregação adquiram cor levemente rósea

VII - lavagem em água corrente

VIII - cobertura de toda a superfície do esfregação em so lução de azul de metileno por 30 segundos, como corante de fun do

IX - lavagem em água corrente

X - secagem com calor suave

3.3.2 - Microscopia

A observação e a contagem dos bacilos álcool-ácido re sistentes (BAAR) por esta técnica são possíveis pela coloração vermelha que adquirem, sobre fundo azul.

Para a análise quantitativa, a União Internacional Con tra Tuberculose (10) preconiza o esquema indicado no Quadro V.

Utilizou-se o microscópio biocular marca ZEISS, stan dardt 14 nº 470914 - 9902/35.

QUADRO V

CRITÉRIOS DE LEITURA DAS LÂMINAS

ausência	BK	por 100 campos :	0
1 a 9	BK	por 100 campos :	anotar cifra
10 a 99	BK	por 100 campos :	+
1 a 10	BK	por campo :	+ +
+ de 10	BK	por campo :	+ + +

3.4 - Cultura

3.4.1 - Tratamento do escarro

O método utilizado foi o de Darzins (25,33), que consiste em:

I - Fração purificadora:

hidróxido de sódio 1,0g
 fosfato trissódico 1,0g
 água destilada 100 ml

II - Fração precipitante:

cloreto de cálcio 0,5g
 água destilada 100 ml

III - Fração solvente:

ácido cítrico 3,0g
 citrato de amônio 2,5g
 citrato de sódio 2,0g
 água destilada 100 ml

Usou-se uma porção de 2 ml de escarro e 5 ml da solução purificadora, agitando-os no agitador de Kahn por 5 minutos, acrescentando-se 1 ml do líquido precipitante e centrifugando-se o material. Após, desprezava-se o sobrenadante e dissolvia-se o precipitado com 0,3 ml da solução solvente.

Nesta fase, o controle de tempo a que a amostra está exposta aos agentes descontaminantes ou mucolíticos deve ser rigoroso.

3.4.2 - Semeadura

O sedimento, agora ressuspenso em salina estéril e neutralizado, era inoculado com 0,3 a 0,5 ml em meio de cultura, e conduzido à estufa a 37°C, realizando-se leituras semanais até 8 semanas. Antes da vedação final do tubo com o meio já semeado, deixava-se evaporar a água de inoculação por algumas horas.

A temperatura da estufa deve ser controlada várias vezes por dia, para que se mantenha regular.

3.4.3 - Meio de cultura

A fórmula de preparação do meio L-J é a seguinte (91,137):

1. fosfato monopotássio anidro (KH_2PO_4) ...	2,4g
2. sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,24g
3. citrato de magnésio	0,6g
4. L-asparagina	3,6g
5. glicerina bidestilada	12,0ml
6. água destilada	600ml
7. ovos	1000ml
8. verde de malaquita 2%	20,0ml

As etapas de preparação vêm relatadas a seguir. Dissolver os componentes 1, 2, 3 e 4 em 200ml de água destilada, aquecendo levemente para melhor dissolução. Filtrar em um fras

co de Erlenmeyer de 2000 ml, ajustando-se o pH até 6,8 e acrescentar 30 g de fécula de batata. Esterilizar em autoclave por 15-30 minutos a 120°C e deixar esfriar. Quebrar os ovos após limpeza cuidadosa com água e sabão e imersão em álcool a 70%, isoladamente, em um pequeno recipiente esterilizado, até completar 1000 ml, para posterior homogeneização em uma cuba contendo pérolas de vidro. Após, adicionar os ovos à solução salina previamente preparada, filtrando-se para que as partículas não homogeneizadas sejam retidas. Acrescentar, em seguida, 20 ml do corante, agitando para misturar bem e deixar em repouso por 30 minutos para que as bolhas de ar contidas no meio venham à superfície. Controlar rigorosamente o pH.

Proceder, então, à distribuição em tubos e levar ao coagulador (que já deve se encontrar a temperatura de 85°C) por um tempo máximo de 50 minutos.

Terminada a coagulação, evitando o esfriamento brusco, colocar na estufa a 37°C por dois dias para observar sua esterilidade e para que seja eliminada a água de condensação. Após isso, arrolhar os tubos e conservá-los em geladeira (+8°C).

A sensibilidade do meio pode variar muito e, para que não ocorram desvios importantes que afetem sua utilidade, é necessário estabelecer um sistema de controle periódico das partidas, semeando quantidades iguais da cepa padrão H37Pv em concentração 10^{-5} e 10^{-6} e contando as colônias após 30 dias, comparando com a característica daquela cepa.

3.4.4 - Controle do crescimento nos tubos

A revisão periódica dos tubos se faz necessária para a avaliação da evaporação da água, verificação de contaminação por flora secundária, análise do pH e verificação de bactérias de crescimento rápido.

A avaliação dos cultivos positivos, com a identificação de *Mycobacterium tuberculosis*, foi feita mediante revisões sema

nais. Os negativos sã eram assim considerados apõs 60 dias de observação.

3.4.5 - Resultados das culturas

Para informar o resultado da cultura, foram utilizados os critérios expostos no Quadro VI (91).

QUADRO VI

CRITÉRIOS DE LEITURA DAS COLÔNIAS

+	+	+	colônias confluentes
+	+		colônias separadas (+ de 100)
+			20 a 100 colônias
n			nº de colônias (menos de 20)
-			nã se observam colônias
c			contaminado

Os resultados foram registrados a partir da observação feita na primeira semana (7 dias), usando-se o critério:

- crescimento positivo:
 - em menos de 7 dias: micobactérias de crescimento rápido
 - em mais de 7 dias : micobactérias de crescimento lento
- ausência de crescimento:
 - nã identificação de colônias apõs 4 semanas de incubação; entretanto permanecia-se observando até completar 8 semanas.

Se o número de colônias desenvolvidas fosse superior a 4, procedia-se ao teste de sensibilidade. A presença de um número pequeno de colônias no primo-cultivo oferece pouca confiabilidade de que a amostra seja representativa da população bacilar do doente (137).

3.5 - Concentração e Proporção Críticas

Distingue-se uma cepa sensível de uma resistente a uma droga pelo número de colônias que se desenvolve em um meio contendo a referida droga.

A concentração de droga usada para tal distinção é padronizada para o meio utilizado e é dita concentração crítica. Os valores referidos são os seguintes para o meio L-J, na variante simplificada do método das proporções (18):

SM*	: 4 μ g/ml
RMP	: 40 μ g/ml
PAS	: 0,5 μ g/ml
INH	: 0,2 μ g/ml
EMB	: 2 μ g/ml

A proporção crítica é o valor relativo, para cada droga, de crescimento bacilar acima do qual a estirpe é considerada resistente e, abaixo, sensível. Para os medicamentos usados, estabeleceu-se essa proporção em 1%, exceto para a SM, que é de 10% (18).

A escolha das drogas a serem usadas no teste regeu-se por sua utilidade nos dias atuais, com duas exceções, o PAS e a pirazinamida. O primeiro foi incluído porque a detecção de bacilos resistentes àquela droga leva a pensar em micobactérias não tuberculosas. A pirazinamida, por outro lado, apesar do seu crescente interesse na clínica, foi excluída do trabalho em razão das dificuldades técnicas que envolvem o teste.

* O valor acima refere-se ao sulfato de dihidroestreptomomicina; como este sal não existe mais no mercado, usa-se sulfato de estreptomomicina em concentração dobrada, conforme informação do Prof. A. Santiago.

3.6 - Preparação dos Meios de Cultura com Drogas

Os meios de cultura com e sem drogas devem ser preparados ao mesmo tempo e poderão ser utilizados até um máximo de dois meses desde sua preparação, se estocados a 4°C (137).

O meio L-J com tuberculostático a ser utilizado para o teste de sensibilidade deve ser preparado mediante a incorporação das drogas antes da coagulação. Entretanto, drogas puras não são disponíveis na maioria das vezes, isto é, o princípio ativo geralmente é encontrado sob forma de sal ou associado a alguma outra substância. Por isso, deve-se corrigir o peso da droga para que se tenha a quantidade ideal para o teste. Esta correção é feita segundo o esquema (147):

- 1) 10,0 mg isoniazida = 10,0 mg INH
- 2) 12,5 mg dihidroestreptomicina = 10,0 mg estreptomicina
- 3) 5,7 mg paraminossalicilato sódico = 5,0 g PAS
- 4) 10,0 mg d-etambutol = 10,0 mg EMB
- 5) 10,0 mg rifampicina = 10,0 mg rifampicina

A potência verdadeira de uma droga é, portanto, o número de microgramas da substância ativa por miligrama de peso total do produto.

Para preparar a solução de INH partiu-se de 500 mg da droga, diluídas em 50 ml de água destilada. Com isso, obteve-se uma solução de 10.000 µg/ml.

Para a preparação das soluções de EMP e RMP procedeu-se do mesmo modo. No que se refere ao PAS e SM, deve-se partir de 570 mg e 615 mg respectivamente, para que se obtenham soluções de 10.000 µg/ml.

A partir destas soluções-mães foram feitas novas diluições para se obter a dose adequada de cada medicamento, para ser incorporado ao meio de cultura, o que era feito parcimoniosamente, buscando obter uma mistura homogênea da droga com o

meio e na concentração crítica previamente estabelecida.

O passo seguinte foi a distribuição em tubos para posterior coagulação por tempo não maior que 50 minutos e não mais de 85°C, para não haver diminuição da atividade da droga.

3.7 - Teste de Sensibilidade

O método utilizado foi o das proporções, de Canetti, Rist e Grosset (18), em sua variante econômica. Usou-se o meio de Loewenstein-Jensen para cultura; a prova foi do tipo indireta.

A técnica de semeadura foi a seguinte:

I - colheita com alça de platina, retirando colônias de vários pontos da superfície

II - emulsão das colônias em salina estéril em um frasco contendo pérolas de vidro

III - agitação mecânica até homogeneizar a suspensão

IV - correção da turbidez segundo a suspensão-padrão, determinando a chamada suspensão-mãe

V - preparação de 6 diluições a partir da suspensão-mãe, comparáveis à suspensão-padrão, em escala dicimétrica, utilizando tubos com 9 ml de água destilada, rotulados com as concentrações de 10^{-1} a 10^{-6} com o emprego de pipetas diferentes para cada diluição

VI - uso das diluições 10^{-3} e 10^{-5} para o teste, desprezando-se as demais

VII - obtenção de 6 tubos em série em cada concentração

VIII - substituição do chumaço de algodão pela rolha de borracha, após 24-48 horas, quando estiver evaporado o líquido excedente.

A suspensão padrão tem como objetivo estabelecer um parâmetro. Sua preparação é a seguinte: pesam-se aproximadamente 20 mg de massa bacilar de cepa H37Rv e coloca-se em um frasco com pērolas de vidro contendo 0,5 ml de água destilada estéril para proceder à homogeneização. A seguir, adiciona-se mais água, até se ter uma suspensão de 1 mg/ml, ou seja, até completar o volume de 20 ml.

A leitura deve ser feita contando-se as colônias nos tubos de controle, calculando-se uma média, o que fornecerá o número de bacilos semeados. Procede-se da mesma forma com as colônias desenvolvidas nos tubos com antibióticos. A relação entre o número de bacilos semeados e o número de mutantes resistentes a essa droga dará a porcentagem de resistentes à droga. Compara-se esse valor com a proporção crítica estabelecida para o fármaco em questão para se saber se a cepa é sensível ou resistente.

Os resultados são lidos aos 28 e confirmados aos 42 dias. A primeira leitura só é definitiva quando já se preenchem os critérios de resistência. Somente a apreciação feita aos 42 dias dará o resultado definitivo para as estirpes sensíveis.

3.8 - Prova da Niacina

Com o objetivo de descartar possíveis cepas atípicas, é necessário, no mínimo, realizar a prova da niacina antes de informar o resultado (137).

3.8.1 - Procedimentos

A determinação da produção de niacina pelas sementes examinadas foi feita pela técnica do brometo de cianogênio reagindo com anilina. Para a realização do teste, a cultura deve ter de 50 a 100 colônias, com crescimento de 3 a 4 sema

nas, e se utilizam uma solução alcoólica de anilina a 4% e uma solução de brometo de cianogênio a 10% como reativos.

O brometo de cianogênio é preparado com:

água destilada	4,0 ml
bromo	0,2 ml
cianeto de sódio a 10% ...	gotejar até o descoloramento

Colocar 1 ml de solução fisiológica na cultura em meio L-J, deixando em repouso por 15 minutos. A seguir, remover com pipeta esterilizada 0,5 ml do extrato líquido da cultura e colocar em um tubo ao qual se acrescentará 0,5 ml de anilina; adicionar igual volume de solução aquosa de brometo de cianogênio, a 10%. A leitura é feita pela coloração que imediatamente a mistura adquire (91).

3.8.2 - Resultados

Foram considerados niacina positivos os tubos que adquiriram coloração amarela e classificados de uma a quatro cruces, de acordo com a intensidade da coloração. Foram ditos negativos os que não mudaram de cor (91).

3.8.3 - Interpretação

Sabe-se que poucas espécies de micobactérias além do bacilo de Koch produzem niacina (entre elas *Mycobacterium simi*ae, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium marinum*). Desse modo, a presença de cor após a realização da técnica, o que caracterizará um teste positivo, provavelmente implicará a presença de *Mycobacterium tuberculosis*, uma vez que dificilmente serão encontradas as outras espécies em produtos patológicos humanos(91, 137).

4 - RESULTADOS

Pelos critérios apresentados na seção anterior, foram selecionados 163 pacientes para realização de novas baciloscopias no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para eliminar possíveis informações inverídicas por parte dos pacientes, realizaram-se, em todos os casos, entrevistas prévias, em momentos distintos, por dois profissionais especializados. Ainda assim, face à impossibilidade de se obterem dados rigorosamente confiáveis com aquela técnica (22,67), optou-se por qualificar como iniciais as cifras de resistência encontradas.

Quanto à procedência dos enfermos, a análise dos registros mostra a distribuição indicada no Quadro VII.

QUADRO VII

PROCEDÊNCIA DOS DOENTES

Centro de Saúde nº 1	28
Centro de Saúde nº 2	36
Centro de Saúde nº 3	55
Centro de Saúde N.H.	44
Total	163

Apresenta-se, a seguir, a casuística, com suas particularidades, a partir da qual foram elaboradas as tabelas desta secção.

QUADRO VIII

LEVANTAMENTO DE CASUÍSTICA

Nº	BACILOSCOPIA	CULTURA	OBSERVAÇÕES
001	+ + +	-	
002	+ + +	+ + +	
003	-	-	
004	+	-	
005	+ + +	+	
006	+ +	+	
007	+ +	+ + +	
008	+ + +	+ + +	
009	-	+ + +	
010	+ + +	-	
011	-	-	
012	+ + +	+ + +	
013	+ + +	+ + +	
014	+ +	+ + +	INH
015	+	+	
016	-	+ + +	
017	+ + +	+ + +	
018	-	-	
019	+ +	+ + +	

Nº	BACILOSCOPIA	CULTURA	OBSERVAÇÕES
020	+ +	+	
021	+ +	+ + +	
022	+ +	+ + +	
023	+ +	+ +	
024	-	-	
025	+ +	7	
026	+	2	Contaminada
027	+ + +	+ + +	
028	+ +	+	
029	-	-	
030	+ +	+	
031	-	-	
032	+	2	
033	+ +	+	
034	+ +	+	
035	-	+	SM + INH
036	+	+ +	
037	+	+ +	
038	+ +	8	
039	+ + +	10	
040	+	+ +	
041	+ + +	12	
042	+ +	+ +	
043	+ +	+ +	
044	+ +	+ + +	
045	+ +	+ +	
046	+ +	+ +	SM
047	+ +	+ +	SM
048	+ +	6	
049	+ +	10	
050	+ +	10	
051	+ +	+	
052	+	+	SM
053	+ +	+ +	
054	+ +	+ + +	
055	+ +	+ +	
056	+ + +	+ + +	Contaminada
057	-	2	
058	+ +	+	
059	+ +	+	INH
060	-	10	
061	-	5	
062	+ +	+ +	EMB
063	+ + +	+	
064	+	10	
065	+ +	12	
066	-	-	
067	+ + +	+ + +	
068	-	-	
069	+	-	
070	+ +	15	

Nº	BACILOSCOPIA	CULTURA	OBSERVAÇÕES
071	+ +	+	
072	+ +	+	
073	-	-	
074	-	15	
075	+ +	+	
076	-	+ + +	Atípico
077	-	-	
078	+ +	+ +	
079	+ +	+ +	Atípico
080	+ +	+ + +	SM
081	+ +	+	
082	-	-	
083	-	-	
084	-	-	
085	-	+ +	
086	+ +	+	
087	+ +	+	
088	+ +	-	
089	-	10	
090	+	+	SM
091	-	-	
092	-	-	
093	-	-	
094	+ +	+ + +	
095	+ +	+ +	Atípico
096	-	-	
097	+ +	+ + +	
098	+ +	+ + +	
099	+ +	+ + +	
100	+ + +	+ + +	INH
101	+ +	+	
102	+ +	+ + +	
103	+ +	+ +	Atípico
104	sem registro	+ + +	
105	+ + +	+ + +	
106	-	+	Atípico
107	+ +	10	
108	-	-	
109	+ +	+ + +	
110	+ + +	+ + +	
111	+ +	+ + +	
112	+ +	+	
113	+ +	+ + +	
114	+ +	15	INH
115	+ +	+	
116	+ +	+ + +	
117	+ +	+ + +	
118	+ +	+	INH
119	+	-	
120	+ +	+ + +	

Nº	BACILOSCOPIA	CULTURA	OBSERVAÇÕES
121	+ +	+ +	SM + EMB
122	+ +	8	
123	+ +	+ + +	INH SM
124	+ +	+ + +	
125	+ +	+ + +	
126	+ +	+ + +	
127	+ +	+ + +	
128	-	-	
129	+ +	+ + +	
130	+ +	+ + +	
131	+ +	+ + +	
132	+ +	+ + +	
133	+ +	+ + +	
134	+ +	+ + +	
135	+ +	+ + +	
136	+ + +	+ + +	
137	+ + +	+ + +	
138	+ +	+ +	
139	+ +	+ + +	
140	+ + +	+ + +	
141	+ +	+ + +	
142	+ +	+ + +	
143	+ + +	+ + +	RMP
144	+ + +	+ + +	
145	+ +	+ + +	
146	+ +	+ + +	
147	+ +	+ + +	
148	+ +	+ + +	
149	+ +	+ + +	
150	+ + +	+ + +	
151	+ + +	+ + +	
152	+ +	+ + +	
153	+ +	+ + +	
154	+ + +	+ + +	
155	+ +	+ + +	
156	+ +	+ + +	
157	+ +	+ + +	
158	+ +	+ + +	
159	+ + +	+ + +	
160	-	-	
161	-	-	
162	-	-	
163	-	-	

A distribuição dos pacientes, cujas expectorações foram examinadas, está na Tabela IV, de acordo com o sexo e a faixa etária.

TABELA IV

Distribuição dos casos por faixa etária e sexo

IDADE (em anos)	S E X O				TOTAL	
	Masculino		Feminino			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
15 a 24 ...	31	29,52	15	25,86	46	28,22
25 a 34 ...	30	28,57	19	32,76	49	30,06
35 a 44 ...	23	21,90	11	18,96	34	20,86
45 a 54 ...	12	11,43	7	12,06	19	11,65
55 a 64 ...	5	4,76	3	5,17	8	4,91
+ de 65 ...	4	3,81	3	5,17	7	4,29
Total	105	100,00	58	100,00	163	100,00

A parte inicial desta seção estudará o isolamento dos bacilos nas amostras testadas. Com isso, avaliar-se-á a sensibilidade dos métodos empregados no que se refere à fertilidade e à seletividade dos meios de cultura.

O exame direto microscópico foi realizado em 163 amostras e seu resultado pode ser apreciado na Tabela V.

TABELA V

Resultados das baciloscopias

BACILOSCOPIA	NÚMERO	PORCENTAGEM (%)
Positiva	128	78,52
Negativa	34	20,85
Ignorada	1	0,61
Total	163	100,00

A quantificação da riqueza bacilar nas amostras positivas à baciloscopia pode ser analisada na Tabela VI. Os critérios para sua classificação foram descritos anteriormente.

TABELA VI

Distribuição das baciloscopias positivas

BACILOSCOPIA	NÚMERO	PORCENTAGEM (%)
Número exato ...	5	3,90
+	10	7,81
+ +	87	67,97
+ + +	26	20,31
Total	128	100,00

Os resultados dos exames culturais realizados em 163 expectorações acham-se indicados na Tabela VII.

TABELA VII

Resultado das culturas

CULTURA	NÚMERO	PORCENTAGEM (%)
Positiva	132	80,98
Negativa	29	17,79
Contaminada .	2	1,23
Total	163	100,00

A relação entre os resultados obtidos pela microscopia e pela cultura estão na Tabela VIII.

TABELA VIII

Resultados das baciloscopias e das culturas

BACILOSCOPIA	CULTURA	NÚMERO	PORCENTAGEM (%)
Positiva	positiva	120	73,62
Positiva	negativa	6	3,68
Positiva	contaminada	2	1,23
Negativa	positiva	11	6,75
Negativa	negativa	23	14,11
Negativa	contaminada	0	0,00
Sem registro	positiva	1	0,61
Sem registro	negativa	0	0,00
Sem registro	contaminada	0	0,00
Total		163	100,00

Das culturas positivas, quatro foram eliminadas por se tratar de micobactérias não tuberculosas, de acordo com o teste da niacina (casos 76,79,103 e 106). A cepa 95 foi desprezada também por tomar coloração alaranjada. Algumas das características desses casos estão reunidas no Quadro IX.

QUADRO IX
CARACTERÍSTICAS DAS CEPAS ATÍPICAS

Nº CEPA	ASPECTO	COLORAÇÃO	TEMPO DE CRESCIMENTO	NIACINA
76	liso	pardo	- de 7 dias	negativa
79	liso	pardo	- de 7 dias	negativa
95	liso	laranja	+ de 7 dias	positiva*
103	rugoso	pardo	+ de 7 dias	negativa
106	rugoso	pardo	+ de 7 dias	negativa

Para a realização do teste de sensibilidade, foram excluídos outros dois casos, por apresentarem culturas com pequeno número (inferior a 4) e que, conforme recomendação da OMS (137) não se prestam para tal avaliação por não serem, provavelmente, representativos da população bacilar existente no paciente.

Desse modo, o teste de sensibilidade foi feito em 125 amostras. O crescimento dessas culturas, bem como o de outras 7 que posteriormente foram eliminados, podem ser vistos na Tabela IX, classificados de acordo com os critérios expostos no Quadro VI.

*) A positividade do teste da niacina foi imputada à presença de colônias de M.tuberculosis, tratando-se de uma cultura mista.

TABELA IX

Crescimento das culturas

RESULTADOS	NÚMERO	PORCENTAGEM (%)
Até 20 col ...	19	14,39
+	39	29,54
+ +	20	15,15
+ + +	54	40,91
Total	132	100,00

Dos 125 testes, 16 mostraram resistênciã a uma ou mais drogas (12,80%) enquanto que 109 (87,20%) foram sensíveis às drogas testadas.

Na Tabela X, pode-se observar a distribuição dos casos conforme o número de drogas a que são resistentes.

TABELA X

Porcentagem de resistênciã inicial
a uma ou mais drogas em 125 cepas

TIPO DE CEPA	NÚMERO	PORCENTAGEM (%)
Sensível	109	87,20
Resist.a 1 droga	14	11,20
Resist.a mais de 1 droga	2	1,60
Total	125	100,00

A resistênciã a cada uma das drogas pode ser examinada na Tabela XI.

TABELA XI

Resistência global a cada droga

DROGA	SENSÍVEL		RESISTENTE		TOTAL
	Nº	(%)	Nº	(%)	
INH	118	94,40	7	5,60	125
SM	117	93,60	8	6,40	125
PAS	125	100,00	0	0,00	125
EMB	123	98,40	2	1,60	125
RMP	124	99,20	1	0,80	125

Houve dois casos de resistência associada (casos 35 e 121), com a seguinte combinação de tuberculostáticos: SM + INH e SM + EMB.

As 16 cepas que apresentaram alguma forma de resistência provieram de amostras de escarro com abundância de bacilos, como se pode ver na Tabela XII, onde 13 (81,25%) estirpes provieram de amostras ricas em bacilos enquanto que 3 (18,75%), vieram de amostras paucibacilares. Para avaliação estatística, os casos foram distribuídos em dois grupos, conforme maior ou menor abundância de bacilos no escarro. Aplicando-se o teste de qui quadrado, não foi encontrada associação significativa entre as variáveis, isto é, a pequena proporção de resistentes no grupo +/- se deve ao pequeno número de casos existentes nessa categoria. Um caso foi retirado da análise por ser de baciloscopia ignorada.

TABELA XII

Relação entre baciloscopia e sensibilidade

BACILOSCOPIA	SENSÍVEL		RESISTENTE		TOTAL
	Nº	(%)	Nº	(%)	
-/+	15	13,89	3	18,75	18
++/+++	93	86,11	13	81,25	106
Total	108	100,00	16	100,00	124

Na Tabela XIII os resultados deste trabalho são comparados aos de outros autores nacionais. Foi aplicado o teste Z, adotando-se nível de significância de $\alpha = 0,05$, pelo qual não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos dados de Magarão e de Lima Fº.

TABELA XIII

Porcentagem de resistência inicial encontrada em diferentes levantamentos

RESISTÊNCIA	Nº e % DE CASOS ESTUDADOS					
	8764*		267**		125***	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
INH	487	5,6	26	9,7	7	5,6
SM	614	7,0	29	10,9	8	6,4
PAS	79	0,9	6	2,2	0	0,0

* - levantamento efetuado por Magarão e cols.(85)

** - levantamento efetuado por Lima Fº e cols.(77)

*** - levantamento efetuado neste trabalho

Para possibilitar a comparação, utilizaram-se somente os casos resistentes a SM, INH e PAS, não tendo sido computada a resistência ao EMB ou RMP.

5 - DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes aos de outros levantamentos nacionais recentes, como os realizados no Rio de Janeiro (85), São Paulo (77) e Minas Gerais (comunicação pessoal do Prof. A.Santiago).

Assim, enquanto Lima FQ e colaboradores (77), em São Paulo, registravam, em 1972, índices de resistência primária a uma droga da ordem de 6,95%, no mesmo ano, no Rio de Janeiro, Magarão e colaboradores (85) encontravam 7,6% de resistência a pelo menos uma droga. A comparação dos dados desses dois trabalhos com os aqui obtidos não revelou diferença estatisticamente significativa.

A proximidade desses valores sugere que resultados também homogêneos poderiam ser encontrados em relação a outros estados. Entretanto, essa hipótese só poderá ser confirmada pela realização de um levantamento, especialmente dirigido para esse fim, abrangendo todo o país.

Levantamentos de resistência primária que incluam vários estados são raros no Brasil. Em 1967, Rosenberg e colaboradores (118) revisaram dados de pesquisadores brasileiros obtendo uma visão global da resistência primária em diversos estados do Brasil. As variações encontradas estão registradas no Quadro III Mais recentemente, Lima FQ e colaboradores (77) publicaram sua experiência com material proveniente de alguns estados, porém não mencionaram eventuais diferenças regionais.

As diferenças encontradas nos índices de resistência bacilar dentro da população de um país, abordadas anteriormente, não são, a julgar pelos dados descritos, reproduzíveis no Brasil. As divergências existentes nos programas estaduais de controle da tuberculose, como a estratégia de investigação dos sintomáticos respiratórios, o emprego de diversos esquemas medicamentosos e a adoção de diferentes programas de vacinação, não teriam bastado para determinar o surgimento de populações bacilares diferentes nas várias regiões do Brasil. Tampouco os movimentos migratórios internos e externos parecem ter influenciado no fenômeno da resistência bacilar.

Por outro lado, quando se comparam os níveis atuais de resistência inicial com os dos anos 60, constata-se uma leve diminuição. Essa tendência só pôde ser seguida, ao longo dos anos, em poucos centros, entre eles Rio de Janeiro (85) e São Paulo (77,118). Confrontando-se as investigações realizadas em São Paulo, percebiam-se indícios de que o descenso da resistência primária global foi mais significativo na década de 60, tendendo a estabilizar-se nos últimos anos.

Nota-se que os maiores níveis de resistência encontrados são à SM e à INH. Esse também foi o achado de Magarão e colaboradores (85) e Lima Fº e colaboradores (77,118); anteriormente, essas duas drogas também foram as que mais selecionaram mutantes resistentes (118). A análise comparativa dos dados aqui encontrados com os de algumas outras investigações atuais (Tabela XIII não mostrou diferença estatisticamente significativa também sob este aspecto, indicando, mais uma vez, a semelhança de comportamento da resistência nas regiões consideradas.

O reduzido número de estirpes resistentes ao EMB e à RMP foi um dado relevante encontrado, por sugerir serem esses os medicamentos de escolha para o tratamento em massa no nosso meio, considerando o enfoque da resistência.

Dos 16 casos com algum tipo de resistência, somente 2 (1,60%) apresentaram resistência a mais de uma droga, supondo-se, com isso, que esquemas múltiplos deverão ter sucesso na maio

ria das vezes. Lima F9 e colaboradores (77) e Magarão e colaboradores (85) mostraram, em seus respectivos materiais, que a resistência múltipla também era pouco expressiva. Esse achado é nitidamente diferente do encontrado nos anos 60, quando a resistência a 2 ou 3 drogas mostrava índices elevados (118).

Os resultados aqui encontrados correspondem aos apontados pela OMS para a América Latina, em cujo Manual de Bacteriologia de la Tuberculosis (114) lê-se a seguinte afirmação: "La magnitud del fenómeno de la resistencia inicial en América Latina es aproximadamente de 12% y la mayor frecuencia corresponde a resistencia a estreptomycin sola y a isoniacida sola. La resistencia a dos y tres drogas a la vez es baja".

A baciloscopia prévia, positiva em todos os casos na Rede de Baciloscopia da Secretaria da Saúde, foi confirmada em somente 78,52% em uma segunda amostra. Esse número crescerá para 80,98% se forem considerados os crescimentos das culturas. Para o esclarecimento desta situação, procedeu-se à revisão dos casos em que houve discordância entre os resultados da microsscopia dos dois serviços ou entre a baciloscopia e a cultura deste trabalho. Foram encontradas as seguintes situações:

I - Baciloscopia positiva nas duas amostras com cultura negativa: 6 casos.

O não crescimento das culturas a partir de amostras que contenham bacilos pode ser devida a dois fatores: presença de bacilos inviáveis ou procedimentos técnicos inadequados. Na primeira possibilidade, o BK pode estar em sofrimento por três causas fundamentais: descontaminação excessivamente severa no momento da sementeira, ação de tuberculostáticos e retardo entre a colheita do material e sua sementeira.

O crescimento da estirpe controle H37Pv permite afirmar pela correção da técnica empregada; como os pacientes eram necessariamente virgens de tratamento e como o intervalo até a sementeira, neste grupo, não foi maior que 96 horas, a explicação para estes casos parece estar relacionada ao processo de

descontaminação. O índice de contaminação encontrado neste material (1,23%) é coerente com essa possibilidade, uma vez que foi menor que o de outros autores como Chaves e Magarão (25) e o do próprio Darzins (33).

II - Baciloscopia positiva na primeira amostra, negativa na segunda, com cultura positiva: 11 casos.

Deste grupo de pacientes, 10 apresentaram baciloscopia (+) e um (++) na Secretaria da Saúde, indicando que, na maioria das vezes, tratava-se de doença inicial, com amostras paucibacilares. A identificação do agente somente ocorreu com um método mais sensível como a cultura. Em 8 dos 11 prontuários havia menção de lesões radiológicas mínimas, confirmando a hipótese de doença inicial.

III - Baciloscopia positiva na primeira amostra, negativa na segunda, com cultura negativa: 23 casos.

Dos 23 casos, triados previamente como positivos após uma revisão nos arquivos da Secretaria da Saúde, puderam ser identificados como pacientes inscritos no Programa de Controle da Tuberculose apenas 14. Os outros 9 não tiveram tuberculose confirmada, tendo sido tratados para outras pneumopatias. Dos 14 casos confirmados observou-se que em 3 houve, apesar dos cuidados tomados, um atraso de até 20 dias entre a inscrição na Secretaria da Saúde e o exame no laboratório de Microbiologia da UFRGS, determinando com esse intervalo possivelmente o sofrimento do BK e prejuízo à viabilidade dos bacilos contidos na amostra. Dos 11 restantes, 5 eram casos iniciais, com baciloscopia (+) na Secretaria da Saúde, sendo possível que uma segunda amostra de escarro pudesse não conter bacilos. Quanto aos demais, não foi encontrada a razão para o fenômeno.

A porcentagem de casos com doença confirmada e cultura negativa relatados nos levantamentos varia muito, estando os valores encontrados dentro do esperado (36,43,73).

IV - Baciloscopia positiva na primeira amostra, sem registro na segunda, com cultura positiva: 1 caso.

A revisão do prontuário da Secretaria da Saúde mostrou tratar-se de baciloscopia (++) inicialmente.

Outro aspecto a considerar é o rendimento adicional do exame cultural a partir de amostras negativas à baciloscopia. A detecção de casos nesse grupo tem um rendimento variável, conforme a população estudada. Se contiver um número grande de amostras paucibacilares, o acréscimo de positividade será grande. Caso contrário, o rendimento será bem menor. Segundo Santiago (119), esse valor variou em limites amplos como 10,7%, encontrados no Instituto da Saúde de São Paulo, até 29,7% do Instituto Brasileiro de Investigação da Tuberculose, da Bahia, passando pelos 12,3% do referido autor. O rendimento encontrado neste material explica-se pela seleção prévia dos pacientes, isto é, todas as amostras eram positivas ao primeiro exame. Dos 34 casos de baciloscopia negativa na segunda amostra, em 25 houve confirmação da doença e, deste grupo, obtiveram-se 11 culturas positivas, significando um rendimento de 44%.

Puderam ser identificadas, no grupo estudado, cinco culturas de bacilos classificados como micobactérias não tuberculosas (casos 76, 79, 95, 103 e 106) correspondendo a 3,78% do total de culturas. As características dessas variedades estão indicadas no Quadro IX. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos brasileiros. Andrade e Santiago (5) isolaram 3,8% de amostras de micobactérias ditas atípicas, enquanto que Lima F9 e colaboradores (77), ao longo de 8 anos de investigação, encontraram esses bacilos em proporção que variou de 0,57% até 3,33%. Em nosso meio, Borges (11) descreveu 20% de culturas niacino-negativas, mas seus casos nem sempre provieram de material humano, o que pode explicar essa aparente discrepância.

Entretanto, nenhuma significação patológica pôde ser atribuída a essas 5 amostras, pois foram isoladas uma só vez. Prignot e colaboradores (109) incluem dentre os critérios de patogenicidade o isolamento exclusivo, repetido e direto da amostra atípica. Andrade e Santiago (5) referem-se a outros autores mais exigentes ainda para aceitar a correlação clínica. Por fu

gir à proposta deste trabalho, não se procurou essa correlação, ou a identificação das micobactérias.

Dificuldades encontradas, e que não puderam ser resolvidas, impediram que o levantamento fosse realizado, além da capital, em algumas cidades do interior, representativas de determinadas regiões do Estado. Somente com a coordenação de um órgão central, apoiado por equipes regionais, é que poderá ser mais adequadamente, retratada a situação da resistência bacilar no Rio Grande do Sul. Também as inúmeras causas de erro, o custo elevado e o tempo necessário para a execução dos testes fazem com que seja reforçada essa sugestão de centralização para futuros levantamentos em resistência bacilar. A concentração de esforços em um único laboratório regional para a execução dos estudos de sensibilidade é unanimemente recomendada pelos organismos internacionais de luta contra a tuberculose.

Entretanto, face ao grande número de tuberculosos existentes na região metropolitana, os resultados aqui registrados podem, com certas precauções, ser estendidos a toda a população gaúcha. Acresce-se a isso o fato de que o esquema terapêutico utilizado nos últimos anos é o mesmo, conforme uma padronização rigidamente seguida, tornando mínimas as variações em cada localidade.

6 - CONCLUSÕES

O isolamento de micobactérias e a determinação dos níveis de resistência inicial do *Mycobacterium tuberculosis* nas amostras de escarro estudadas, provenientes de pacientes não tratados previamente, permitem concluir que:

- 1º) a resistência global encontrada foi de 12,80%;
- 2º) as drogas a que mais frequentemente os bacilos são resistentes foram a estreptomomicina (6,40%) e a hidrazida (5,60%);
- 3º) o número de cepas resistentes ao etambutol, rifampicina e PAS foi pequeno, respectivamente de 1,60%, 0,80% e 0,00%;
- 4º) a resistência ocorreu mais frequentemente a uma droga, sendo rara a resistência simultânea a dois ou mais tuberculostáticos (1,60% a duas drogas);
- 5º) a frequência da resistência e o número e tipo de drogas a que o *M. tuberculosis* é resistente foram próximos aos encontrados por outros autores nacionais e aos previstos pela Organização Mundial de Saúde para a América Latina;
- 6º) houve um provável declínio da resistência inicial no Rio Grande do Sul;
- 7º) a frequência relativa de micobactérias não tuberculosas foi de 3,78%.

7 - RESUMO

Foi realizado um estudo em resistência bacteriana, com um enfoque especial para o *Mycobacterium tuberculosis*. Fez-se também uma apreciação das implicações clínicas do fenômeno à luz de levantamentos realizados no Brasil e no exterior. Discutiram-se os testes de sensibilidade, examinando-se seu posicionamento nos programas de saúde pública e em medicina individual.

Para testar a sensibilidade dos bacilos isolados a partir de amostras de escarro de tuberculosos não tratados previamente, empregou-se o método das proporções de Canetti, Rist e Grosset. As drogas utilizadas foram a estreptomina, hidrazida, rifampicina, etambutol e PAS.

A resistência a uma ou mais de uma droga encontrada foi de 12,80%, com predomínio de germes resistentes a uma droga somente. Os medicamentos que com maior frequência selecionaram mutantes resistentes foram a estreptomina (6,40%) e hidrazida (5,60%).

Os resultados encontrados mostraram semelhanças aos apontados por outros levantamentos.

8 - SUMMARY

A study in bacterial resistance was performed, with a special focus on *Mycobacterium tuberculosis*. An evaluation of the clinical implications was made on the light of surveys carried out in Brazil and abroad. Tests of sensitivity and their role in programs of Public Health and in Individual Medicine were examined.

Canetti, Rist and Grosset's method of proportions was used to test the sensitivity of bacilli isolated from samples of patients with tuberculosis who had not been treated before. The drugs employed were streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol and PAS.

The degree of resistance to one or more drugs was 12,80%, predominating the bacilli which was resistant to only one drug. Streptomycin (6,40%) and isoniazid (5,60%) selected the resistant mutants with greater frequency.

The results proved to be similar to those pointed out by other surveys.

9 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - ACOCCELLA, G. et alii. Can rifampicin use be safely extend? Evidence for non-emergence of resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. The Lancet, London, 1 (8014) 740-2, Apr.2, 1977.
- 2 - ALBERGHINA, M. & PALERMO, F. Mutational studies of the drug resistance of *M.tuberculosis* with special reference to p-Aminosalicylic Acid, Ethambutol, Isoniazid and Pifampicin. Bolletino Dell Istituto Sieroterapico Milanese, Milan, 54(6):437-44, 1975.
- 3 - ALBERGHINA, M. et alii. Genetic determinants of aminoglycoside resistance in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Chemotherapy, Basel, 19(3):148-60, 1973.
- 4 - AMARAL GURGEL, J.T. & AZEVEDO, J.L. Resistência de microrganismos aos antibióticos. In: LACAZ, C.S.,ed.Antibióticos. 3 ed. São Paulo, Edgar Blücher, Universidade de São Paulo, 1975.
- 5 - ANDRADE, L. & SANTIAGO, A.C. Micobactérias não tuberculosas (atípicas) na Guanabara. I.Métodos de isolamento, identificação e incidência. Revista da Divisão Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 124-45, 2.trim. 1971.
- 6 - ARMSTRONG, A.R. & WALKER, A.M. Distribution of streptomycin-sensitive tubercle bacilli in lungs of a "resistant" patient. Canadian Medical Association Journal, Toronto, 60:383-4, Apr., 1949.

- 7 - AYUELA, P.M. et alii. Epidemiologic significance of primary resistance in Spain; refutation of the concept of transmission of resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Chest, Chicago, 72(5):683-4, Nov. 1977.
- 8 - BARONTI, A. & LUKINOVICH, N. A pilot trial of rifampicin in tuberculosis. Tubercle, Edinburgh, 49(2):180-6, June, 1968.
- 9 - BARTMANN, K. & GALVEZ-BRANDON, J. Towards an international standardization of resistance tests on mycobacteria. Scandinavian Journal of Respiratory Diseases, Stockholm, 49:141-52, 1968.
- 10 - BOLETIN DE LA UNION INTERNACIONAL CONTRA LA TUBERCULOSIS. Guia técnica para el diagnóstico de la tuberculosis por microscopia directa. 3.ed., Paris, 1978. Suplemento n 2, Dr. Annik Rouillon.
- 11 - BORGES, M.R.S. Contribui o ao estudo bacteriológico de micobactérias; provas bioquímicas. Porto Alegre, 1976. Tese para Concurso de Livre Docência em Microbiologia. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 12 - BRYSON, V. & DEMEREC, M. Bacterial resistance. Am.J.Med., 18: 723, 1955. Apud. FRAGA, H. Contribui o ao estudo da quimioterapia da tuberculose pulmonar. Rio de Janeiro, Instituto de Fisiologia e Pneumologia da Universidade do Brasil, 1961, p.183.
- 13 - BYRD, R.B. et alii. Treatment of pulmonary tuberculosis. Chest, Chicago, 66(6):560-7, Dec. 1974.
- 14 - CANETTI, G.(1955). Quelques imprécisions dans méthodes couramment employées pour la détermination de l'isoniazido-resistance du bacille tuberculeux, leur ampleur et leur inconvénient. Bull.Int.Un.Tuberc., 25:157-78. Apud. BARTMANN, K. & GALVEZ, BRANDON, J. Towards and international standardization of resistance tests on mycobacteria. Scandinavian Journal of Respiratory Diseases, Stockholm, 49:151, 1968.

- 15 - _____. (1957) Quelques remarques sur la diversité des critères de résistance actuellement employés. Bull.Int.Un. Tuberc., 27:222-5. Apud BARTMANN, K. & GALVEZ-BRANDON, J. Towards and international standardization of resistance tests on mycobacteria. Scandinavian Journal of Respiratory Diseases, Stockholm, 49:151, 1968.
- 16 - _____. Host factors and chemotherapy of tuberculosis, In: Chemotherapy of Tuberculosis, Butterworths, London, 1964, p.175. Apud. FOX, W. Changing concepts in the chemotherapy of pulmonary tuberculosis. American Review of Respiratory Diseases, New York, 97(5):786, May, 1968. (The John Barnwell lecture).
- 17 - _____. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. American Review of Respiratory Diseases, New York, 92(5):687-703, Nov. 1965. (The John Barnwell lecture).
- 18 - CANETTI, G. & GROSSET, J. Techniques et indications des examens bactériologiques en tuberculose. Saint-Mandé, Éditions de la Tourelle, 1968. 193p. (Collection "Techniques de Base", M.R. Dujarric de la Rivière).
- 19 - CANETTI, G. & SAENZ, A. La streptomycine-résistance de souches de bacilles de Koch provenant de lésions pulmonaires différents d'un même malade. Annales de l'Institut Pasteur, Paris, 80(3):238-54, 1951.
- 20 - CANETTI, G. et alii. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions; méthodologie, critères de résistance résultats, interprétations. Revue de Tuberculoses, Paris, 27(2/3):217-72, fév./mars, 1963.
- 21 - CANETTI, G. et alii. Mycobacteria; laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bulletin World Health Organization, Genève, 29:565-78, 1963.
- 22 - CANETTI, G. et alii. Advances in techniques of testing my

- cobacterial drug sensitivity , and the use of sensitivity test in tuberculosis control programmes. Bulletin World Health Organization, Genève, 41(1):21-43, 1969.
- 23 - CANETTI, G. et alii. Trends in the prevalence of primary drug resistance in pulmonary tuberculosis in France from 1962 to 1970; a national survey. Tubercle, Edinburgh, 53:57-83, June, 1972.
- 24 - CHAIEB, J.A.; TIGRE, G.; SCLIAR, M. Antibiograma e evolução clínica de pacientes "virgens de tratamento" no Hospital Sanatório Partenon. Revista de Associação Médica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 8(3):101-2, 1964.
- 25 - CHAVES, C.B. & MAGARÃO, M.F. O método agitação-precipitação no diagnóstico bacteriológico da tuberculose. O Hospital, Rio de Janeiro, 5:601-6, maio, 1954.
- 26 - CHEUNG, O.T. Drug-resistant pulmonary tuberculosis; an analysis of 103 cases admitted to the Toronto Hospital, 1970 to 1973. American Review of Respiratory Diseases, New York, 111(6):900, June, 1975.
- 27 - CITRON, K.M. Drug resistance in respiratory tuberculosis: chemotherapy with reserve drugs. In: HEAF, F. & RUSBY, N.L. ed. Recent advances in respiratory tuberculosis. 6.ed. London, J & A Churchill, 1968.
- 28 - COMBINED chemotherapy in tuberculosis. British Medical Journal, 1(4911):465-6, Feb. 19, 1955. (Leadings Articles). Apud. CHAIEB, J.A. Tratamento da tuberculose; passado, presente e novas perspectivas. Revista Medicina ATM, Porto Alegre, 7(1):113, 1972.
- 29 - COMROE, J.H.Jr. Pay dirt; the story of streptomycin. Part I - From Waksman to Waksman. American Review of Respiratory Diseases, New York, 117(4):773-81, Apr. 1978.

- 30 - _____. Pay dirt; the story of streptomycin. Part II - Feldman and Hinshaw; Lehman. American Review of Respiratory Diseases, New York, 117(4):957-68, May, 1978.
- 31 - COWLEY, R.G. & BRINEY, R.R. Primary drug-resistant in Vietnam veterans. American Review of Respiratory Diseases, New York, 101(5):703-5, May, 1970.
- 32 - CROFTON, J. & MITCHISON, D.A. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. British Medical Journal, London, 2(4588):1009-15, Dec. 11, 1948.
- 33 - DARZINS, E. & PUKITE, A. Cultivation of acid-fast organisms from tuberculous patients after prolonged and intensive treatment. American Review of Respiratory Diseases, New York, 89(2):277-79, 1964.
- 34 - DAVID, H.L. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. Applied Microbiology, Baltimore, 20(5):810-4, Nov. 1970.
- 35 - DEVADATTA, S. et alii. Response of patients infected with isoniazid-resistant tubercle bacilli to treatment with isoniazid plus PAS or isoniazid alone. Bulletin World Health Organization, Genève, 25:807-29, 1961.
- 36 - DOSTER, B. et alii. A continuing survey of primary drug resistance in tuberculosis, 1961-1968. A U.S. Public Health Service Cooperative Study. American Review of Respiratory Diseases, New York, 113(4):419-25, Apr. 1976.
- 37 - FAIRSHTER, R.D. et alii. Failure of isoniazid prophylaxis after exposure to isoniazid-resistant tuberculosis. American Review of Respiratory Diseases, New York, 112(1):37-42, July, 1975.
- 38 - FELDMAN, W.H. & HINSHAW, H.C. Effects of streptomycin on experimental tuberculosis in guinea pigs; a preliminary report. Proceedings Staff Meetings Mayo Clinic, Rochester, 19(26):593-9, Dec. 27, 1944.

- 39 - FOX, W. Changing concepts in the chemotherapy of pulmonary tuberculosis. American Review of Respiratory Diseases, New York, 97(5):767-90, May 1968. (The John Barnwell lecture).
- 40 - _____. General considerations in the choice and management of regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. Bulletin International Union Against Tuberculosis, Paris, 47:49-67, 1972.
- 41 - _____. The modern management and therapy of pulmonary tuberculosis. Proceedings Royal Society Medicine, London, 70(1):4-15, Jan. 1977.
- 42 - _____. Estado actual de la quimioterapia acortada de la tuberculosis. Bolletín de la Unión Internacional contra la Tuberculosis, Paris, 53(4):278-91, 1978.
- 43 - FOX, W. et alii. The prevalence of drug-resistant tubercle bacilli in untreated patients with pulmonary tuberculosis; a national survey, 1955-56. Tubercle, London, 38(2):71-84, Apr. 1957.
- 44 - FRAGA, H. Contribuição ao estudo da quimioterapia da tuberculose pulmonar. Rio de Janeiro, Instituto de Tisiologia e Pneumologia da Universidade do Brasil, 1961. 188p.
- 45 - FRAGA, H.; MAGARÃO, M.F.; ALMEIDA, A.P. A resistência do bacilo de Koch aos agentes antimicrobianos e suas repercussões na profilaxia da tuberculose. Revista do Serviço Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 3(12):459-66, 4.trim. 1959.
- 46 - FRAGA, H.; MAGARÃO, M.F.; DAUSTER, J. Influência do tipo de lesão pulmonar no aparecimento da estreptomycino-resistência. Clínica Tisiológica, 7:75, 1952. Apud. FRAGA, H. Contribuição ao estudo da quimioterapia da tuberculose pulmonar. Rio de Janeiro, Instituto de Tisiologia e Pneumologia da Universidade do Brasil, 1961. p.186.

- 47 - FRAGA, H.; MAGARÃO, M.F.; SANTIAGO, A.C.; ALMEIDA, A.P. Contribution à l'étude de la résistance d'emblée du bacille tuberculeux aux médicaments standard, à Rio de Janeiro. Proceedings of the XVI th. International Tuberculosis Conference, Toronto, Sept. 1961.
- 48 - FRAGA, H.; MAGARÃO, M.F.; DAUSTER, J.; SANTIAGO, A.C.; ALMEIDA, A.P. O problema da quimioterapia da tuberculose pulmonar no Rio de Janeiro, visto através da frequência da resistência microbiana. Revista do Serviço Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 10(38): 157-60, 2.trim. 1966.
- 49 - GANGADHARAM, P.R. & GONZALES, E.R. Influence of the medium on the "in vitro" susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol. American Review of Respiratory Diseases, New York, 102(4):653-5, Oct. 1970.
- 50 - GELBART, S.M. & JUHASZ, S.E. (1970). Genetic transfer in *Mycobacterium phlei*. Journal of General Microbiology, 64: 253. Apud JONES, W.D. et alii. Transduction of a streptomycin R-factor from *Mycobacterium smegmatis* to *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Tubercle, Edinburgh, 55: 73-80, 1974.
- 51 - GROSSET, J. Debe hacerse un estudio de sensibilidad en todo caso nuevo de tuberculosis? Bolletín de la Union International contra la Tuberculosis, Paris, 53(3): 209-10, Sept. 1978.
- 52 - GROSSET, J. & CANETTI, G. Differences de teneur des souches de *Mycobacterium tuberculosis* en variants résistants a la streptomycine selon la variété de streptomycine et le milieu de culture employés. Annales de L'Institut Pasteur, Paris, 101(2):234-52, 1961.
- 53 - HAUDUROY, P. Sur un appareil "séparateur de germes" pouvant dans certains cas remplacer les micromanipulateurs. Annales de L'Institut Pasteur, Paris, 77(3):307-10, 1949.

- 54 - HERRERA, M.C. et alii. Resistencia primária en 126 casos de tuberculosis pulmonar. Salud Pública de Mexico, Ciudad de Mexico, 18(1):111-3, ene./feb. 1976.
- 55 - HERSKOWITZ, I.H. How genetic material is varied, packaged and distributed. In: _____. Principles of genetics. 2. ed. New York, MacMillan, 1977.
- 56 - _____. Mutations that make bacteria resistant to a drug occur spontaneously prior to an exposure to the drug. In: _____. Principles of Genetics, 2.ed. New York, MacMillan, 1977. (Cap.8. supplementary section).
- 57 - HINSHAW, H.C. & FELDMAN, W.H. Streptomycin in treatment of clinical tuberculosis; a preliminary report. Proceedings Staff Meetings Mayo Clinic, Rochester, 20(18): 313-8, Sept. 5, 1945.
- 58 - HOBBY, G.L. Primary drug resistance: A continuing study of tubercle bacilli in a veteran population within the United States. VI. Initial observations on the incidence of resistance to rifampicin and ethambutol. American Review of Respiratory Diseases, New York, 99(5): 777-9, May, 1969.
- 59 - _____. Primary drug resistance: A continuing study of drug resistance in tuberculosis in a veteran population within the United States. VII. September 1965 to September 1969. American Review of Respiratory Diseases, New York, 102(3):347-55, Sept. 1970.
- 60 - _____. Primary drug resistance: A continuing study of drug resistance in tuberculosis in a veteran population within the United States. IX. September 1969 to September 1970. American Review of Respiratory Diseases, New York, 103(6):842-4, June, 1971.
- 61 - _____. The rifamycins, a unique series of antimicrobials. Chest, Chicago, 61(6):517-8, June, 1972. (Special issue).

- 62 - HOBBY, G.L. & JOHNSON, G.E. Primary drug resistance: A continuing study of drug resistance in tuberculosis in a veteran population within the United States. V. September 1963 to September 1965. American Review of Respiratory Disease, New York, 94(5):703-8, Nov. 1966.
- 63 - HOBBY, G.L. et alii. A continuing study of primary drug resistance in tuberculosis in a veteran population within the United States. I. American Review of Respiratory Diseases, New York, 89(3):337-49, Mar. 1964.
- 64 - HOBBY, G.L. et alii. Primary drug resistance: a continuing study of drug resistance in tuberculosis in a veteran population the United States. American Review of Respiratory Diseases, New York, 110(1):95-8, July, 1974.
- 65 - HONG KONG TUBERCULOSIS TREATMENT SERVICES/BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL INVESTIGATION. A study in Hong Kong to evaluate the role of pretreatment susceptibility test in the selection of regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. American Review of Respiratory Disease, New York, 106(1):1-22, July, 1972.
- 66 - _____. A study in Hong Kong to evaluate the role of pretreatment susceptibility tests in the selection of regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis - second report. Tubercle, Edinburgh, 55:169-92, 1974.
- 67 - HORNE, N.W. Drug resistant tuberculosis: a review of the world situation. Tubercle, Edinburgh, 50(suppl.):2-12, Mar. 1969.
- 68 - HOWARD, W.L.; MARESH, F.; MUELLER, E.F.; YANITELLI, S.A.; WOODRUFF, G.F. The role of pulmonary cavitation in the development of bacterial resistance to streptomycin, Amer.Rev.Tuberc., 1949, 59:391. Apud CANETTI, G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. American Review of Respiratory Diseases, New York, 92(5):701, Nov, 1965.

- 69 - HOWLETT, H.S.Jr.; O'CONNOR, J.B.; SADUSK, J.F.Jr.; SWIFT, J. F.; BEARDSLEY, F.A. Sensitivity of tubercle bacilli to streptomycin: the influence of various factors upon the emergence of resistant strains. Amer.Rev. Tuberc., 1949, 59:402. Apud CANETTI, G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. American Review of Respiratory Diseases, New York, 92(5): 701, Nov. 1965.
- 70 - JOHNSTON, R.F. & WILDRICK, K.H. American Review of Respiratory Diseases, New York, 110(5):685, Nov. 1974. (Correspondence).
- 71 - JONES, W.D. et alii. Transduction of a streptomycin R-factor from *Mycobacterium smegmatis* to *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv. Tubercle, Edinburgh, 55:73-80, 1974.
- 72 - KERTCHER, J.A. et alii. Rapid radiometric susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. American Review of Respiratory Diseases, New York, 117(4):631-7, Apr. 1978.
- 73 - KOPANOFF, D.E. et alii. A continuing survey of tuberculosis primary drug resistance in the United States: March 1975 to November 1977. A United States Public Health Service Cooperative Study. American Review of Respiratory Diseases, New York, 118(5):835-42, Nov. 1978.
- 74 - LANGEROVĀ, M. & ZAVADILOVA, Z. (1968). The incidence of sensitive and resistant tubercle bacilli in children suffering from pulmonary and extra pulmonary tuberculosis during the 1963-1966 period. Rozhledy y Tuberkulose, 28:681. Apud. CANETTI, G. et alii. Trends in the prevalence of primary drug resistant in pulmonary tuberculosis in France from 1962 to 1970; a national survey. Tubercle, Edinburgh, 53:57-83, June, 1972.
- 75 - LEIRIA, B.P. Teste de resistência bacilar. Revista de Tuberculose e Doenças do Tórax do Hospital Sanatório Belém, Porto Alegre, 8/9/10:19-20, 1962/3.

- 76 - LIMA Fº, M.T. Antibioticoterapia na tuberculose. In: LACAZ, C.S., ed. Antibióticos. 3.ed. São Paulo, Edgard Blücher, Universidade de São Paulo, 1975.
- 77 - LIMA Fº, M.T.; OLIVEIRA, A.G.; NISHI, I.; SARAIVA, L.G.P.; MELO, F.A.F. Resistência primária do *Mycobacterium tuberculosis* no Brasil. Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, 26(6):182-4, 1980.
- 78 - LURIA, S.E. & DELBRUCK, M. Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics, Austin, 28: 491-511, 1943.
- 79 - MACLATCHY, J.K. Susceptibility testing of mycobacteria. Laboratory Medicine, Philadelphia, 9(3):47-52, 1978.
- 80 - MACDONALD, J.B. *Mycobacterium tuberculosis* resistance to rifampicin and Ethambutol: a clinical survey. Thorax, London, 31(1):1-4, Feb. 1977.
- 81 - MCDANIEL, R.E. et alii. A rapid radiometric method for determining the sensitivity of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* several chemotherapeutic agents. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, Saint Louis, 89(4):861-7, Apr. 1977.
- 82 - MCDERMOTT, W. Microbial drug resistance. American Review of Respiratory Diseases, New York, 102(6):857-76, Dec. 1970 (The John Barnwell lecture).
- 83 - MAGALHÃES, M. A incidência no Recife da resistência primária do bacilo tuberculoso às drogas standard. Revista do Serviço Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 9(34):117-21, 2.trim.1965.
- 84 - MAGARÃO, M.F.; DAUSTER, J.; SANTIAGO, A.C. Resistência do bacilo de Koch às drogas standard e de reserva (experiência da Guanabara). Arquivos Brasileiros de Tuberculose e Doenças do Tórax, Salvador, 25(1):3-6, 1966.

- 85 - MAGARÃO, M.F.; MORTATTI, R.C.; LIMA, A.O. O complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Rio de Janeiro, Fundação Ataulpho de Paiva, 1980.
- 86 - MAGARÃO, M.F.; DAUSTER, J.; HIRSCH, E.W.; SANTIAGO, A. I-Bacteriologia; padronização das técnicas empregadas na bacteriologia da tuberculose. Revista do Serviço Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 3(11):295-311, 3.trim. 1959.
- 87 - MAGARÃO, M.F.; FRAGA, H.; DAUSTER, J.; SANTIAGO, A.C.; ALMEIDA, A.P. Informação sobre a freqüência da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas standard no Rio de Janeiro, entre 1958 e 1966. Revista do Serviço Nacional de Tuberculose, 11(44):435-9, 4.trim. 1967.
- 88 - MAGARÃO, M.F.; DAUSTER, J.; SANTIAGO, A.C.; WERNECK, E.; FRAGA, H.; ALMEIDA, A.P.; BARRETO, R.C.R. The problem of the resistance of *M.tuberculosis* to standard drugs in Rio de Janeiro, Brazil. Advances in Tuberculosis Research, Basel, 11:193-213, 1961.
- 89 - MALMSTEN, L.H. Estudios de sensibilidade con fines epidemiológicos y operacionales. In: CURSO Regional de Bacteriología de la Tuberculosis, 8, Caracas, 5 jun/2 ago, 1974 (mimeogr.).
- 90 - _____. La resistencia del *Mycobacterium tuberculosis*. In: CURSO Regional de Bacteriología de la Tuberculosis, 8, Caracas, 5 jun/2 ago, 1974 (mimeogr.).
- 91 - _____. Cultivo y examen microscópico. In: POLLACK, L. Congresso Brasileiro de Microbiología, 7, Porto Alegre, 25-9 jul. 1976.
- 92 - MEDICAL RESEARCH COUNCIL INVESTIGATION; Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis. British Medical Journal, London, 2 (4582):769-82, Oct.30, 1948.

- 93 - _____. The prevention of streptomycin resistance by combined chemotherapy. British Medical Journal, London, 1 (4769):1157-62, May 31, 1952.
- 94 - MIDDLEBROOK, G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli. Am.Rev.Tuberc., 69:471, 1954. Apud. DOUB, B.S.L. The chemical structures, properties, and mechanisms of action of the antituberculous drugs. In: YOUMANS, G.P. Tuberculosis. Philadelphia, W.B.Saunders, 1979.
- 95 - MIDDLEBROOK, G. & COHN, M.L. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. Science, 118:297, 1953. Apud. DOUB, B.S.L. The chemical structures, properties and mechanisms of action of the antituberculous drugs. In: YOUMANS, G.P. Tuberculosis. Philadelphia, W.R.Saunders, 1979.
- 96 - MITCHELL, R.S. The importance of laboratory susceptibility testing in tuberculosis. Annals New York Academy of Sciences, New York, 106(1):52-61, Feb.28, 1963.
- 97 - MITCHISON, D.A. The segregation of streptomycin-resistants of *Mycobacterium tuberculosis* into groups with characteristic levels of resistance. Journal of General Microbiology, London, 5(3):596-604, 1951.
- 98 - _____. Sensitivity testing. In: HEAF.F. & RUSBY, N.L. ed. Recent advances in respiratory tuberculosis, 6.ed. London, J & A Churchill, 1968.
- 99 - MITCHISON, D.A. & DICKINSON, J.M. Mecanismos bactericidas en la quimioterapia de corta duración. Bolletín de la Union Internacional contra la Tuberculosis, Paris, 53 (4):263-68, 1978.
- 100 - MURRAY, B.E.; MOELLERING, R.C. Patterns and mechanisms of antibiotic resistance. Medical Clinics of North America, Boston, 62(5):899-923, Sept. 1978.

- 101 - NEW drugs against tuberculosis. The Lancet, London, 1(7605): 1081-2, May 31, 1969. (Leading Articles).
- 102 - NEWCOMBE, H.B. & HAWIRKO, R. Spontaneous mutation to streptomycin resistance and dependence in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, Baltimore, 57(5):565-72, May, 1949.
- 103 - NITTI, V. Antituberculosis activity of rifampicin; report of studies performed and in progress (1966-1971). Chest, Chicago, 61(6):589-98, June, 1972. (special issue).
- 104 - PEREIRA, M.A.M. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos antibióticos e quimioterápicos. Porto Alegre, Globo, 1961. Tese livre docência da cadeira de Microbiologia, Universidade do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina.
- 105 - PIEN, F.D. et alii. Primary antituberculous drug resistance in Hawaii, 1957 to 1977. American Review of Respiratory Diseases, New York, 118(4):701-4, Oct. 1978.
- 106 - POPPE DE FIGUEIREDO, F. Treatment of patients with pulmonary tuberculosis classified according to the history of previous chemotherapy and without reference to pre-treatment drug sensitivity. Tubercle, London, 50(4): 335-43, Dec. 1969.
- 107 - POPPE DE FIGUEIREDO, F. & GARANGUAN, F.M. A resistência bacteriana no Conjunto Sanatorial Curicica. Revista do Serviço Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 6(21): 95-101, 1. trim. 1962.
- 108 - POPPE DE FIGUEIREDO, F. & GERHARDT FÖ, G. Resultados dos testes de sensibilidade nos doentes classificados como VT e PS ao serem admitidos no Hospital Estadual Santa Maria e inscritos no Dispensário Escola da C.N.C.T. Revista do Serviço Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 10(38):179-90, 2. trim. 1966.

- 109 - PRIGNOT, J. & SIMON-POUTHIER, F. Rev.Tuberc.Pneumol.1970, 34:37-52. Apud. ANDRADE, L. & SANTIAGO, A.C. Micobactérias não tuberculosas (atípicas) na Guanabara. Revista da Divisão Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 15(58):124-45, 2.trim. 1971.
- 110 - PYLE, M.M. et alii. A four year clinical investigation of ethambutol in initial and retreatment cases of tuberculosis; efficacy, toxicity and bacterial resistance. American Review of Respiratory Diseases, New York, 93 (3):428-41, Mar. 1966.
- 111 - RADNER, D.B. Changing concepts in treatment of tuberculosis. Chest, Chicago, 61(6):520-3, June,1972. (special issue).
- 112 - RASSEGNA Medica e Cultural. Resistência aos antibióticos. São Paulo, ago. 1973. (Cadernos monográficos).
- 113 - REICHMAN, L.B. et alii. Tuberculosis in the foreign born. American Review of Respiratory Disease, New York, 116 (3):561-4, Sept.1977.
- 114 - RESISTENCIA del *M.tuberculosis* a los quimioterápicos. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de bacteriología de la tuberculosis; técnicas y procedimientos básicos. Washington, 1973.(CD/TB-ST/LAB).
- 115 - RIST, N. La resistance du bacille tuberculeux à l'hydrazide isonicotinique. Presse Med., 60:806, 1952. Apud. FRAGA, H. Contribuição ao estudo da quimioterapia da tuberculose pulmonar. Rio de Janeiro, Instituto de Fisiologia e Pneumologia da Universidade do Brasil,1961.
- 116 - RIST, N. & CROFTON, J. Drug resistance in Hospital and Sanatorias. Bulletin International Union Against Tuberculosis, Paris, 30(1):2-44, 1960.
- 117 - RIST, N. & GRUMBACH, F. La resistance du bacille tuberculeux à l'hydrazide isonicotinique (INH). Rev.Tuberc., 15:665, 1952. Apud. FRAGA, H. Contribuição ao estudo

- da quimioterapia da tuberculose pulmonar. Rio de Janeiro, Instituto de Fisiologia e Pneumologia da Universidade do Brasil, 1961. p. 175.
- 118 - ROSEMBERG, J.; WAISBICH, E.; PASSOS Fº, M.C.R. Resistência primária em 906 casos de tuberculose pulmonar prevenientes de diversas regiões do Brasil. Revista do Serviço Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 11(43):311-37, 3.trim. 1967.
- 119 - SANTIAGO, A.C. A baciloscopia e a cultura nos programas de luta contra a tuberculose. Revista da Divisão Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro, 14(56):283-92, out./dez. 1970.
- 120 - SANTIAGO, A.C. & DAUSTER, J. Evolução dos métodos de determinação da resistência do bacilo de Koch aos medicamentos antibacilares. Arquivos Brasileiros de Tuberculose e Doenças do Tórax, Salvador, 25(1):7-15, 1966.
- 121 - SCHIFMAN, P.L. et alii. Drug resistant tuberculosis in a large Southern California hospital. American Review of Respiratory Diseases, New York, 116(5):821-5, Nov.1977.
- 122 - SCHMIDT, L.H.; GROVER, A.A.; HOFFMAN, R.; REHM, J.; SULLIVAN, R. Emergence of isoniazid-sensitive bacilli in monkeys inoculated with isoniazid-resistant strains, Tr. Seventeenth Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis, Veterans Administration-Armed Forces, 1958, p.264. Apud. ZITRIN, C. & LINCOLN, E. Initial tuberculosis infection due to drug-resistant organisms; with a review of the world literature on initial infection due to isoniazid-resistant tubercle bacilli. The Journal of Pediatrics, Saint Louis, 58(2):224, Feb. 1961.
- 123 - SILVA, R.P.; MORENO, C.; KNIES, C.B.; MOTTA, M.H.S.; GUEDES, P. Redação Técnica, 2.ed. Porto Alegre, Formação, 1974.

- 124 - STEINER, M. et alii. Primary tuberculosis in children: correlation of susceptibility patterns of *M. tuberculosis* isolated from children with those isolated from source cases as an index drug-resistant infection in a community. American Review of Respiratory Diseases, New York, 98(2):201-9, Aug. 1968.
- 125 - STEINER, M. et alii. Primary drug-resistant tuberculosis: report of an outbreak. The New England Journal of Medicine, Boston, 283(25):1353-8, Dec.17, 1970.
- 126 - STEINER, P. et alii. Primary drug resistance in children; drug susceptibility of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from children during the years 1969 to 1972, at the Kings County Hospital Medical Center of Brooklyn. American Review of Respiratory Diseases, New York, 110(1):98-100, July, 1974.
- 127 - STEINER, P. et alii. Primary isoniazid-resistant tuberculosis in children; clinical features, strain resistance, treatment and outcome in 26 children treated at Kings County Medical Center of Brooklyn between the years 1961 and 1972. American Review of Respiratory Diseases, New York, 110(3):306-11, Sept. 1974.
- 128 - STEINER, P. et alii. Primary drug resistance in children; drug susceptibility of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from children during the years 1973 through 1977 at Kings County Hospital Center of Brooklyn. American Review of Respiratory Diseases, New York, 119(4):680-2, Apr. 1979.
- 129 - STEWART, S.M. & CROFTON, J.W. The clinical significance of low degrees of drug resistance in pulmonary tuberculosis. American Review of Respiratory Diseases. New York, 89(6):811-29, June, 1964.
- 130 - STOTTMEIER, K.D. Emergence of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Massachusetts. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, 133(1):88-90, Jan. 1976.

- 131 - STOTTMEIER, K.D. & BAKER, S. Primary drug resistant tuberculosis in Massachusetts, 1975/76. The New England Journal of Medicine, Boston, 296(14):823, Apr. 7, 1977.
- 132 - STOTTMEIER, K.D. & BURKES, J. Primary drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Massachusetts in 1972. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, 130(3):293-4, Sept. 1974.
- 133 - SULA, L. Comparative trials with different decontaminating agents for growing *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. Bulletin of the World Health Organization, Genève, 39(5):647-55, 1968.
- 134 - SULA, L. & SUNDARESAN, T.K. WHO co-operative studies on a simple culture technique for the isolation of mycobacteria. 2. Comparison of the efficacy of lyophilized liquid medium with that of Lowenstein-Jensen (L-J) medium. Bulletin World Health Organization, Genève, 29:607-625, 1963.
- 135 - SULA, L. et alii. A comparison of the sensitivity of Lowenstein-Jensen media prepared in different national bacteriological laboratories. Bulletin of the World Health Organization, Genève, 23(4/5):653-68, 1960.
- 136 - TAVARES DE LIMA Fº, M. Proceedings of Fifth International Symposium on Chemotherapy of Tuberculosis, Madrid, 1976. Apud. ACOCCELA, G. et alii. Can rifampicin use be safely extended? Evidence for non-emergence of resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. The Lancet, London, 1(8014):742, Apr. 2, 1977.
- 137 - TÉCNICA del estudio de sensibilidad. In: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de bacteriología de la tuberculosis; técnicas y procedimientos básicos. Washington, 1973 (CD/TB-ST/LAB).

- 138 - THOMAS, H.E. The Birmingham tuberculosis drug resistance register 1956-70. Tubercle, Edinburgh, 53(1): 1-8, Mar. 1972.
- 139 - TRIPATHY, S.P. et alii. Response to treatment with isoniazid plus PAS of tuberculosis patients with primary isoniazid resistance. Tubercle, London, 50: 257-68, Sept. 1969.
- 140 - TSUKAMURA, M. Resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* to ethambutol. Acta Tuberculosea et Pneumologica Scandinavica, Kobenhavn, 46(2):89-92, 1965.
- 141 - _____. The pattern of resistance development to rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle, Edinburgh, 53(2):111-7, June, 1972.
- 142 - _____. Variation and heredity of mycobacteria with special reference to drugs resistance. Jap.J.Tuberc., 9:43-64 (1961). Apud. ALBERGHINA, M. et alii. Genetic determinants of aminoglycoside resistance in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Chemotherapy, Basel, 19(3):159, 1973.
- 143 - _____. Loss of hexuple resistance to aminoglycoside antibiotics in *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) by mutation to isoniazid resistance and by at high temperature. Journal of General Microbiology, London, 98(2):611-4, Feb. 1977.
- 144 - TSUKAMURA, M. & MIZUNO, S. Cross-resistance relationships among the aminoglycoside antibiotics in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of General Microbiology, London, 88(2):269-74, June, 1975.
- 145 - UNITED STATES PUBLIC HEALTH SERVICE COOPERATIVE INVESTIGATION. Prevalence of drug resistance in previously untreated patients. American Review of Respiratory Diseases, New York, 89(3):327-36, Mar. 1964.

- 146 - VALENZUELA, P.H. et alii. Evolución de la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* en Chile. Revista de Medicina de Chile, Santiago, 101:30-3, 1973.
- 147 - VESTAL, A.L. Procedure for the isolation and identification of mycobacteria. Atlanta, U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1978. (New Publication No.(CDC)79-8230).
- 148 - VILLAS BOAS, A. & PINHEIRO RAMOS, H. O hospital na luta contra a tuberculose no Brasil. Rev.Paulista Tis. e Tórax, 19:305, 1958. Apud. FRAGA, H. Contribuição ao estudo da quimioterapia da tuberculose pulmonar. Rio de Janeiro, Instituto de Fisiologia e Pneumologia da Universidade do Brasil, 1961.
- 149 - WILDER, N.J. et alii. Patterns of drug resistance in the tuberculous oriental immigrant. American Review of Respiratory Diseases, New York, 115:410, Anr.1977. (Abstract. Annual Meeting Supplement).
- 150 - WEINSTEIN, L. Antimicrobial agents; drugs used in the chemotherapy of tuberculosis and leprosy. In: GOODMAN, L.S. & GILMAN, A., ed. The pharmacological basis of the therapeutics. 5 th.ed. New York, MacMillan Publishing, 1975.
- 151 - YOUMANS, G.P. Tuberculosis. Philadelphia, W.B.Saunders, 1979.
- 152 - YOUMANS, G.P. & KARLSON, A.G. Streptomycin sensitivity to tubercle bacilli. Studies on recently isolated tubercle bacilli and the development of resistance to streptomycin in vivo. Am.Rev.Tuberc., 55:529, 1947. Apud. HINSHAW, H.C. Treatment of tuberculosis. In: YOUMANS, G.P. Tuberculosis. Philadelphia, W.B. Saunders, 1979.
- 153 - YOUMANS, G.P.; WILLISTON, E.H.; FELDMAN, W.H.; HINSHAW, H. C. Increase in resistance of tubercle bacilli to streptomycin: a preliminary report. Proc.Staff Meet.

Mayo Clin., 21:126, 1946. Apud. HINSHAW, H.C. Treatment of tuberculosis. In: YOUMANS, G.P. Tuberculosis Philadelphia, W.B.Saunders, 1979.

154 - ZACK, M.B. et alii. The effect of radiation on microbiologic characteristics of *M.tuberculosis*. Chest, Chicago, 66(3):240-3, Sept. 1974.

155 - ZITRIN, C. & LINCOLN, E. Initial tuberculosis infection due to drug-resistant organisms: with a review of the world literature on initial infection due to isoniazid-resistant tubercle bacilli. The Journal of Pediatrics, Saint Louis, 58(2):219-25, Feb. 1961.