

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**DETECÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium tuberculosis*
ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO EM MICROPLACAS**

CANDICE TOSI MICHELON

Porto Alegre, novembro de 2008.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Candice Tosi Michelin

**DETECÇÃO DO DNA DE *Mycobacterium tuberculosis*
ATRAVÉS DE HIBRIZAÇÃO EM MICROPLACAS**

**Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular da
UFRGS como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Mestre.**

Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Co-Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, novembro de 2008.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) com apoio financeiro da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Financiadora de Estudo e Projetos (FINEP) e da Rede-TB.

AGRADECIMENTOS

- A Dra Maria Lucia Rosa Rossetti, por ter me acolhido no CDCT e por ter me orientado no desenvolvimento deste trabalho;
- A Dra Rosa Dea Sperhacker, por ter sempre sido minha guia e por sempre estar lá pronta para ajudar no que fosse preciso;
- A Dra Cláudia Maria Dornelles da Silva, por ter tido paciência para me ensinar o que é e como se faz uma PCR;
- A colega Franciele Rosso, por ter me ajudado tantas vezes na execução deste trabalho;
- A Karen Schmid, minha IC, por ter finalizado a análise das minhas amostras;
- As colegas especiais do mestrado, Cintia Costi, Mirela Verza, Regina Bones Barcellos e Raquel de Abreu Maschmann, por estarem ao meu lado freqüentando as cadeiras e os seminários do PPG;
- Aos demais colegas do CDCT que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;
- A Dra Elis Regina Dalla Costa, pela companhia e pelo apoio durante a preparação desta dissertação;
- Ao Antonio, por ter estado ao meu lado ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho;

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 5 |
| LISTA DE TABELAS..... | 7 |
| RESUMO..... | 8 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1.1 História da Tuberculose..... | 11 |
| 1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 13 |
| 1.3 Transmissão..... | 15 |
| 1.4 Imunologia..... | 17 |
| 1.5 Manifestações Clínicas..... | 18 |
| 1.6 Tratamento..... | 20 |
| 1.7 Diagnóstico..... | 22 |
| 1.7.1 Métodos Bacteriológicos..... | 23 |
| 1.7.1.1 Amostra..... | 24 |
| 1.7.1.2 Baciloscopia..... | 24 |
| 1.7.1.3 Cultura para Micobactéria..... | 26 |
| 1.7.1.4 Métodos para Detecção do Crescimento Micobacteriano.. | 27 |
| 1.7.2 Testes Imunoserológicos..... | 29 |
| 1.7.2.1 Prova Tuberculínica..... | 29 |
| 1.7.2.2 <i>Interferon Gamma Release Assay</i> | 30 |
| 1.7.3 Métodos Radiológicos..... | 31 |
| 1.7.4 Métodos Moleculares..... | 32 |
| 1.7.4.1 Métodos Comerciais..... | 33 |
| 1.7.4.2 Métodos <i>in house</i> | 35 |
| 1.7.4.3 Aplicação Clínica do Diagnóstico Molecular..... | 39 |
| 2. OBJETIVOS..... | 40 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 40 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 40 |
| 3. MANUSCRITO..... | 41 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 51 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AAN | Amplificação de Ácidos Nucléicos |
| AFB | <i>Acid Fast Bacilli</i> |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| BAAR | Bacilo Álcool-Ácido Resistente |
| BCG | Bacilo de <i>Calmette Guérin</i> |
| BSA | Soro de Albumina Bovina |
| °C | Graus Celsius |
| CDC | <i>Centers for Disease Control</i> |
| CDCT | Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| cDNA | Ácido Desoxiribonucléico complementar |
| CI | Intervalo de Confiança |
| Da | Daltons |
| DNA | Ácido Desoxiribonucléico |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FDA | <i>Food and Drugs Administration</i> |
| FEPPS | Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde |
| fg | Fentograma |
| h | Horas |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HUCFF | Hospital Universitário Clementino Fraga Filho |
| IGRA | <i>Interferon Gamma Release Assay</i> |
| IS | Elemento de Inserção |
| IUATLD | <i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i> |
| kDa | Quilo Daltons |
| LJ | <i>Löwenstein-Jensen</i> |
| LPHA | Laboratório de Pesquisa em HIV/AIDS |

| | |
|--------|---|
| M | Molar |
| MDR | Multidrogarresistente |
| mg | Miligramas |
| min | Minutos |
| mM | Milimolar |
| MODS | <i>Microscopic Observation Broth Drug Seseptibility Assay</i> |
| MTB | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| NAA | <i>Nuclaic Acid Amplification</i> |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| NB2 | Nível de Biossegurança 2 |
| nm | Nanômetros |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| pb | Pares de bases |
| PBST | <i>Phosphate Buffered Saline with Tween</i> |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PPD | <i>Purified Protein Derivative</i> |
| PPGBCM | Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular |
| RFLP | <i>Restriction Fragment Lenght Polymorfism</i> |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| rpm | Rotações por minuto |
| rRNA | Ácido Ribonucléico ribossomal |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SSC | <i>Saline–Sodium Citrate</i> |
| TB | Tuberculose |
| TE | Tris-EDTA |
| TMB | 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidine |
| TSA | Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos |
| VPN | Valor Preditivo Negativo |
| VPP | Valor Preditivo Positivo |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| ZN | <i>Ziehl-Neelsen</i> |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de baciloscopia sugeridos pela OMS e IUATLD.

RESUMO

Para auxiliar no controle da tuberculose são necessários novos métodos de detecção de *Mycobacterium tuberculosis* que sejam rápidos, específicos e de aplicabilidade em laboratórios de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Vários métodos moleculares de detecção e identificação de micobactérias em amostras clínicas têm sido desenvolvidos. Com o objetivo de padronizar e aplicar essas metodologias em laboratório foi desenvolvido um protocolo baseado na amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) e na detecção colorimétrica em microplacas. Uma região interna do elemento de inserção IS6110, específico do complexo *M. tuberculosis*, foi selecionada como alvo para amplificação por PCR com *primers* biotinizados. Uma sonda complementar a uma região interna do fragmento foi fixada em microplacas onde, posteriormente, foi hibridizado o produto amplificado. A detecção através de hibridização foi feita utilizando um conjugado estreptavidina peroxidase. A eficácia da técnica foi testada em amostras clínicas pulmonares de pacientes com suspeita de infecção e sem tratamento prévio para tuberculose. O padrão ouro no diagnóstico de infecção por *M. tuberculosis* foi a associação da baciloscopia com a cultura a partir da amostra clínica dos pacientes selecionados. Foram testadas 303 amostras de escarro induzido de 303 pacientes com suspeita de TB pulmonar, dos quais 69 apresentaram resultado positivo e 234 negativo para TB. A sensibilidade e especificidade obtidas foram 88% e 98% e os Valores Preditivos Positivo (VPP) e Negativo (VPN) foram 92% e 97%, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que a técnica desenvolvida no presente estudo pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico de tuberculose e poderia ser utilizada como um teste complementar no diagnóstico da doença.

ABSTRACT

New methods to detect *Mycobacterium tuberculosis* rapidly, accurately and that are feasible to apply in laboratories of developing countries are necessary. Several methods for direct detection and identification of mycobacteria in clinical samples have been developed. With the aim to standardize the application of such methods in laboratory, we developed a molecular method for DNA extraction and PCR detection using a microwell plate hybridization assay. An internal region of the repetitive element, specific of *M. tuberculosis* complex, called IS6110 was selected as a target for amplification using specific biotinylated primers. The detection of amplified fragments was performed using microwell plates. An aminated DNA fragment complementary to an internal region of the amplified fragment was used as a probe. The biotinylated amplified products were added to the plate and identified with the use of streptavidin conjugated to horseradish peroxidase. The efficacy of the method was tested to detect pulmonary tuberculosis in patients suspected of TB infection with no previous treatment. As gold standard, the bacteriological criteria was used. Three hundred and three induced sputum samples from 303 pulmonary TB suspects were evaluated, of which 69 showed positive result and 224 negative for TB. The sensitivity and specificity obtained were 88% and 98% and Positive and Negative Predictive Values were 92% and 98%, respectively. The obtained results demonstrated that the PCR detection using a microwell plate hybridization assay may be an important tool for the diagnosis of tuberculosis and suggest that it could be used as a complementary diagnostic method.

1. Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que afeta principalmente os pulmões, podendo se estender a outros órgãos e tecidos do corpo como ossos, rins e meninges. Apesar de seu principal agente causador, *Mycobacterium tuberculosis*, ter sido descoberto em 1882, a TB ainda hoje é um grave problema de saúde pública mundial (BRASIL, 2008A).

Nem todas as pessoas infectadas pelo *M. tuberculosis* irão desenvolver a doença ativa. Em média, uma a cada dez pessoas que entraram em contato com o agente etiológico irá desenvolver a doença ao longo de sua vida, sendo maior essa probabilidade em casos de pacientes portadores do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (WHO, 2007).

A maioria dos casos de TB ocorre em pacientes do sexo masculino em idade produtiva, prejudicando as condições de vida de famílias carentes, que são as maiores vítimas da tuberculose. A TB é uma doença diretamente ligada à pobreza; além das pessoas que vivem em baixas condições sociais, tem maior chance de desenvolver a doença, qualquer um que esteja com as defesas imunológicas comprometida, como os pacientes com AIDS, alcoolismo, câncer, diabetes ou que estejam sofrendo tratamento com imunossuppressores (BRASIL, 2008A). Também são consideradas populações de maior risco pessoas que moram em presídios, manicômios, abrigos e asilos, assim como mendigos e trabalhadores que mantêm contato próximo com doentes de tuberculose (LEÃO & PORTALES, 2007).

No ano de 2006, estima-se que tenham surgido no mundo 9,2 milhões de novos casos de TB, o que corresponde a uma incidência de 139/100.000 habitantes, dos quais 0,7 milhões foram em pacientes HIV positivos e 0,5 milhões de casos de TB multidrogaresistentes (MDR). No mesmo ano, estima-se que tenham ocorrido 1,5 milhões de mortes decorrentes da doença, em pacientes HIV negativos e 0,2 milhões em pacientes HIV positivos (WHO, 2008).

O Brasil ocupa o 16º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% de todos os casos de tuberculose no mundo. Em 2006, a incidência da doença foi de 50/100.000 habitantes, sendo 12% dos novos casos em pacientes HIV positivos e

0,9% casos MDR, e a mortalidade foi de 4/100.000 (WHO, 2008). No Rio Grande do Sul, em 2007, foram notificados 5.482 novos casos de TB, sendo que destes, 2.549 eram bacilíferos (SES, 2008).

1.1 História da Tuberculose

A TB é uma doença conhecida há muito tempo. Há relatos da sua existência no antigo Egito, Índia, China, Roma, na América antes da chegada de Colombo e em Bornéu, também antes do contato europeu (SALO *et al.*, 1994; KONOMI *et al.*, 2002; ZINK *et al.*, 2003; DONOGHUE *et al.*, 2004; SOTOMAYOR *et al.*, 2004; DANIEL, 2006). O seu agente causador, *Mycobacterium tuberculosis*, pode ter sido responsável pela morte de mais pessoas ao longo da história do que qualquer outro patógeno (DANIEL, 2006).

Na Grécia, em torno de 460 antes de Cristo, a TB foi identificada como a doença mais difundida de todos os tempos e costumava ocorrer em pessoas entre 18 e 35 anos. Embora a maioria dos gregos desta época acreditasse que a doença fosse hereditária, Aristóteles a considerou como sendo contagiosa. Já o médico grego Clarissimus Galen a considerou uma ulceração do pulmão, peito e garganta, acompanhada de tosse, febre baixa, consumo do corpo e uma doença ligada à má nutrição (LEÃO & PORTALES, 2007).

Ela se manteve ao longo da história como uma doença endêmica, até o início do século XVII, quando iniciou uma epidemia que se estendeu pelos 200 anos seguintes. Nessa época, a morte decorrente da TB era considerada inevitável e em 1650 ela era a principal causa de mortalidade. A alta densidade populacional e condições sanitárias precárias que caracterizaram o crescimento das cidades na Europa e nos Estados Unidos naquela época criaram o ambiente ideal, nunca conhecido antes na história, para proliferação do bacilo da TB (LEÃO & PORTALES, 2007). Embora a TB já existisse na América e na África antes da colonização européia, foi somente depois desse contato que as taxas da doença começaram a aumentar, chegando, em 1886, a causar 9.000 mortes a cada 100.000 habitantes na América do Norte (BATES & STEAD, 1993).

Uma descrição patológica e anatômica mais precisa da doença começou a surgir no século XVII. Embora nessa época ainda se acreditasse que a doença era hereditária, alguns médicos já começavam a não descartar a possibilidade de transmissão da TB através do contato com o doente, ou com objetos utilizados pelo mesmo (LEÃO & PORTALES, 2007).

Por volta de 1854, quando a TB foi anunciada como uma doença curável, sanatórios começaram a ser estabelecidos para o tratamento dos doentes. Eles exerciam duas funções, protegiam a população em geral através do isolamento dos doentes, que eram o foco das infecções, e ofereciam aos pacientes com TB descanso, exercício, ar fresco e boa nutrição. Por volta de 1860, os sanatórios começaram a fechar e o tratamento começou a ser substituído por uma terapia ativa (LEÃO & PORTALES, 2007).

Durante o século XIX, a TB era vista como uma doença romântica. Sua presença influenciou tanto a literatura da época como a arquitetura, com grandes sacadas, corredores externos cobertos, locais cobertos nos jardins e móveis que poderiam ser limpos e desinfetados facilmente. Em obras literárias, como a “Dama das Camélias”, de Alexandre Dumas, e na ópera de Verdi “La Traviata”, a heroína encontrava a redenção de seus pecados do passado através do consumo progressivo do corpo causado pela TB (LEÃO & PORTALES, 2007).

Em 1865, um médico chamado Jean-Antoine Villemin demonstrou que a doença podia ser transmitida de humanos para o gado e do gado para coelhos. A partir desse experimento, concluiu-se que a tuberculose era causada por um microrganismo específico. Porém, somente em 1882, Robert Koch apresentou o patógeno causador da doença. Utilizando um meio sólido composto de agar e batatas, Koch inventou um meio de obter culturas puras da bactéria (LEÃO & PORTALES, 2007).

Após a descoberta de que a TB era uma doença infecciosa, ela foi definitivamente ligada à pobreza e às más condições de trabalho da época, deixando de ser uma doença facilmente romanceável e passando a ser um indicador vergonhoso de classe social. No início do século XX, as autoridades perceberam que a TB poderia ser prevenida e iniciaram uma grande campanha de

conscientização e educação da população, que logo começou a surtir efeito (LEÃO & PORTALES, 2007).

Em 1921, a primeira vacina contra a TB foi administrada em humanos. Sintetizada entre 1908 e 1919 por Albert Calmette e Camile Guérin, a vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) consiste em uma linhagem atenuada de *Mycobacterium bovis*, e é, até hoje, amplamente utilizada, conferindo proteção principalmente contra TB infantil e formas graves da doença, como a TB miliar (LEÃO & PORTALES, 2007).

Em meados do século XX, com a descoberta dos antimicrobianos e a sua associação com programas de controle da TB, houve uma diminuição significativa dos casos da doença na Europa e nos Estados Unidos. Porém, por volta de 1985, os casos de TB começaram a aumentar novamente em países subdesenvolvidos. Muitos fatores inter-relacionados foram responsáveis por esse ressurgimento, incluindo o aumento da população prisional, dos moradores de rua, o uso de drogas injetáveis e, sobretudo, o surgimento da AIDS. Em 1993 a OMS (Organização Mundial de Saúde) declarou a TB como um problema mundial de saúde pública (BRASIL, 2008A).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis pertence à ordem dos *Actinomycetales*, à família *Mycobacteriaceae* e é um dos componentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), juntamente com *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. A espécie *Mycobacterium canetti* ainda não foi oficialmente reconhecida como membro do complexo MTB (BRASIL, 2008B). Este complexo é um grupo de bactérias geneticamente muito relacionadas, o que dificulta a sua diferenciação por métodos de diagnóstico convencionais. Esta relação taxonômica muito próxima também é refletida no seu alto grau de conservação evolutiva, sendo que a homologia em suas seqüências de DNA é de quase 100% (VAN EMBDEN *et al.*, 1992, SMALL & VAN EMBDEN, 1994, KREMER *et al.*, 1999).

O principal agente causador de TB em humanos é o bacilo *M. tuberculosis*, sendo raras as doenças pulmonares causadas por outras micobactérias. As micobactérias são aeróbias, não formadoras de esporos e não possuem motilidade. Também são álcool-ácido resistentes em reações tintoriais e, em sua grande maioria, são bactérias de crescimento lento, com um tempo de geração de aproximadamente 15 a 20 horas, dependendo da oferta de oxigênio, nutrientes e pH do meio, e levam de 3 a 4 semanas para formar colônias em meios de cultura (COLE, 2002). A morfologia das colônias varia entre as espécies, do aspecto liso ao rugoso, e de pigmentado a não pigmentado. A temperatura de crescimento também varia entre as espécies, de 30°C a 45°C (MURRAY, 1999).

Os bacilos do complexo MTB possuem alto conteúdo lipídico, contendo ácidos graxos com cadeias carbônicas longas C60 - C90 (ácidos micólicos) na parede celular, podendo atingir até 40% do peso seco da célula (GOODFELLOW & MAGEE, 1998). Essa característica é responsável pelas principais atribuições do gênero, como a hidrofobicidade, resistência a danos causados por agentes químicos, incluindo os antimicrobianos, e a baixa permeabilidade celular. Os bacilos são resistentes à ação de agentes químicos, mas sensíveis aos agentes físicos, como radiação ultravioleta e calor, no meio externo, só conseguem sobreviver por algumas horas (BARRERA *et al.*, 2007).

Em 1998, o genoma da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* foi completamente seqüenciado. O genoma desse microrganismo é composto de 4.411.529 pb, contém em torno de 4.000 genes e possui um conteúdo de GC de 65,5% (COLE & BARRELL, 1998). Uma reavaliação completa deste genoma foi apresentada quatro anos depois e foram incluídos 82 novos genes e o tamanho da seqüência passou a ser 4.411.532 pb (CAMUS *et al.*, 2002). Aparentemente, a recombinação gênica ocorre através de *transposons*, que são elementos inerentemente instáveis e têm o potencial de causar muitos tipos de rearranjos, tais como transposição, deleção, inversão e duplicação (MOSTRÖM *et al.*, 2002). A maior parte desses *transposons* são seqüências de DNA repetitivo, particularmente elementos de inserção (IS). Foram descritos 56 elementos de inserção. O elemento IS6110, membro da família IS3, não é somente o mais abundante como também o melhor caracterizado, sendo que o número de cópias

varia de linhagem para linhagem. Uma característica importante em *M. tuberculosis* é a grande capacidade codificante do seu DNA direcionada à produção de enzimas envolvidas na lipólise, o que provavelmente permite que ele permaneça vivo no hospedeiro em tecidos adiposos (COLE & BARRELL, 1998; CAMUS *et al.*, 2002).

M. tuberculosis tem a capacidade de entrar em períodos de latência com uma atividade metabólica limitada, dificultando a ação dos antimicrobianos, contribuindo para a natureza crônica da doença e impondo um regime de tratamento longo. Além disso, existem, numa mesma infecção, populações de bacilos de comportamentos diferentes em função de sua localização e atividade. Assim, os bacilos presentes nas cavidades pulmonares multiplicam-se de forma ativa em um ambiente aeróbio, já os bacilos do interior dos macrófagos o fazem em um ambiente microaerofílico, que induz a latência, e os bacilos que se encontram no interior da lesão caseosa têm ocasionalmente um ciclo replicativo. Por outro lado, se o *M. tuberculosis* pode multiplicar-se nos tecidos, onde a penetração dos antibióticos é fácil, no material caseoso a penetração dos antibióticos é mais difícil (COLL, 2003).

1.3 Transmissão

O bacilo da TB pode ser transmitido através de 3 maneiras, a partir da inalação de gotículas contendo *M. tuberculosis*, ingestão de material contaminado, geralmente leite, e inoculação direta, que ocorre mais freqüentemente entre profissionais da área de saúde. A principal forma de transmissão é por aerossóis de pacientes com doença pulmonar ativa para outras pessoas, através da fala, do espirro e, principalmente, da tosse. Gotículas contaminadas são lançadas no ar, onde as mais pesadas se depositam rapidamente e as mais leves permanecem em suspensão. Apenas 1% dos bacilos sobrevivem por algumas horas nas gotículas suspensas, desde que não estejam expostos à ventilação e a luz solar. Somente os núcleos secos destas gotículas (núcleos de Wells) conseguem atingir os bronquíolos e alvéolos, onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares,

iniciando sua multiplicação. (BRASIL, 1992; SMITH & MOSS; 1994; KRITSKI *et al.*, 2000).

A inalação de poucos bacilos já pode causar uma infecção. Entretanto, na maioria dos indivíduos a infecção mantém-se latente, podendo, inclusive, durar por toda a vida. Justamente por isso, um terço da população mundial encontra-se infectada com *M. tuberculosis*, mas apenas 2 a 5% destas pessoas desenvolverão a doença dentro de um período de 2 anos. No entanto, a chance de uma pessoa previamente infectada com HIV desenvolver TB é de 10% em cada ano de vida, enquanto que, a de uma pessoa não infectada com este vírus é de 5% a 10% em toda a vida (ONYEBUJOH & ROOK, 2004).

Os doentes com a forma pulmonar bacilífera, especialmente as cavitárias, constituem a principal fonte de disseminação da doença. Um paciente pulmonar bacilífero, se não tratado, em um ano pode infectar de 10 a 15 pessoas (BATES, 1980; STEAD & DUTT, 1989). O risco de contágio de contatos intra-domiciliares ou institucionais é de 5% a 20%, e de contatos casuais de 0,2% a 2% (KRITSKI *et al.*, 2000). A descoberta precoce dos doentes bacilíferos entre os sintomáticos respiratórios e outros grupos de risco e a introdução de um tratamento antimicrobiano eficaz, além de curar o doente, reduzem a capacidade de transmissão e, assim, proporcionam a quebra da cadeia epidemiológica da doença (ATS, 2000; TRUJILLO & KRITSKI, 2001).

Até pouco tempo, a detecção e manuseio do paciente portador de TB pulmonar e baciloscopia positiva eram as principais ferramentas no controle da TB na comunidade. Entretanto, com o uso de tipagem molecular tem sido possível demonstrar que mesmo os pacientes com baciloscopia negativa e cultura positiva são responsáveis por 17% a 20% da transmissão da TB, principalmente em grandes centros urbanos com elevada taxa de TB associada a outras comorbidades, como a infecção pelo HIV (BEHR, *et al.*, 1999). Tais dados têm sinalizado para os pesquisadores e formuladores de políticas públicas que se torna necessário identificar outras técnicas para o diagnóstico rápido de TB, mais sensíveis que a baciloscopia e, no mínimo, similares a cultura de micobactérias para serem utilizadas como novas ferramentas no controle da TB.

1.4 Imunologia

Em aproximadamente 90% das pessoas imunocompetentes, as defesas imunes mediadas pelas células são eficazes e não permitem o desenvolvimento da doença (HERNÁNDEZ-PANDO *et al.*, 2007). Este tipo de imunidade é ineficaz em 5% das pessoas infectadas, resultando no desenvolvimento da doença no período de um a dois anos. Em outros 5%, a doença se desenvolve em algum momento da vida em que o sistema imunológico encontra-se debilitado. Durante este período, o bacilo permanece em estado de latência, fazendo com que o portador possa desenvolver TB ativa mesmo muitos anos depois do primeiro contato (reativação endógena) (DYE & FLOYD, 2006).

Na infecção inicial, quando a micobactéria penetra no pulmão de um indivíduo após ser expectorada em minúsculas partículas por um paciente bacilífero, esta é inicialmente fagocitada por um macrófago alveolar, e posteriormente os bacilos sofrem a ação dos neutrófilos. Se o processo de resposta imunológica for ineficiente, ocorre um processo de interação celular entre os macrófagos alveolares e os linfócitos T (CD4+), por meio da liberação de citocinas, com o objetivo de quimiotaxia celular, e resposta imunológica humoral (DYE & FLOYD, 2006).

Os macrófagos fagocitam os bacilos e parte destes são destruídos, mas um contingente expressivo permanece vivo. Os bacilos remanescentes se multiplicam dentro dos fagossomos, no citoplasma do macrófago, ou na cavidade alveolar (BATES, 1980). O bacilo cresce lentamente, dividindo-se, aproximadamente, a cada 25 a 32 horas. Essa multiplicação bacilar provoca destruição de macrófagos, liberação de lisossomas e conseqüente destruição tecidual com reação inflamatória inespecífica e formação de granuloma (caseum), que é a lesão inicial da doença ou primoinfecção. A multiplicação continuará até atingir 10^3 a 10^4 unidades bacilares num período de 2 a 12 semanas. Esta concentração bacilar é suficiente para desencadear uma resposta imune celular, que pode ser capaz de limitar esta multiplicação. Neste momento, a infecção instalada passa a ser detectável por meio da prova tuberculínica. Antes do aparecimento da imunidade celular, os bacilos se disseminam através do sistema linfático atingindo a corrente

sangüínea, e chegando a sítios mais distantes (DANNEMBERG & ROOK, 1994; CHAN & KAUFMANN, 1994; HOPEWELL, 1994; KRITSKI *et al.*, 1998; ATS, 2000).

Os linfócitos T (CD4+) são responsáveis pela formação do granuloma, morte ou inibição da multiplicação bacilar e contenção das lesões, da produção de lisozima, da necrose tecidual e da disseminação da lesão, porém, os linfócitos T (CD8+) também colaboram para a limitação do processo inflamatório (STYBLO, 1991; CHAN & KAUFMANN, 1994).

A evolução para a doença depende de múltiplos fatores relacionados com o microrganismo (virulência/patogenicidade) e com o hospedeiro (imunidade, fatores genéticos, existência de outras doenças). Essa evolução para a TB ativa depende do tipo de infecção que está ocorrendo, ou seja, se o indivíduo está sendo infectado pela primeira vez (primoinfecção ou infecção primária) ou sendo reinfectado (reinfecção exógena). Estima-se que a ocorrência de TB ativa é mais freqüente entre aqueles indivíduos infectados pela primeira vez, principalmente crianças, idosos e/ou imunodeprimidos. Entretanto, os indivíduos previamente infectados pelo bacilo da TB, com prova tuberculínica positiva, apesar de uma defesa imune anterior, podem adoecer caso sejam expostos continuamente à TB (BLOOM & MURRAY, 1992).

Indivíduos infectados pelo HIV, especialmente aqueles com baixa contagem sérica de linfócitos T (CD4+) (menos de 100 células por mm³), desenvolvem a TB rapidamente após serem infectados por *M. tuberculosis*, e entre 10% a 25% destes podem desenvolver a doença nos primeiros 2 anos. Por outro lado, indivíduos que possuem uma infecção latente com *M. tuberculosis* (não tratada) e adquirem a infecção com HIV poderão desenvolver TB em uma taxa de, aproximadamente, 5% a 10% ao ano (ATS, 2000).

1.5 Manifestações Clínicas

A TB é uma doença crônica ou subaguda, podendo apresentar períodos de remissão, retardando o paciente na busca de serviço médico especializado. Esta conduta pode agravar ainda mais seu estado clínico e pode aumentar o tempo de

transmissão do bacilo na comunidade. As manifestações clínicas da TB variam muito e dependem de diversos fatores, inerentes ao microrganismo e ao hospedeiro (imunodeficiência, desnutrição e outros), bem como as suas interações, as quais influenciam diretamente na apresentação clínica da doença (ATS, 2000).

Como a TB normalmente é adquirida por inalação do bacilo, a localização inicial é no pulmão. Posteriormente, pode ocorrer uma disseminação para outros órgãos, causando o que é chamado de tuberculose extrapulmonar (óssea, meningoencefálica, renal, genitourinária e outras.). Após o advento da AIDS, vários estudos têm descrito menor apresentação da forma pulmonar da TB (38%) entre pacientes com infecção por HIV na fase avançada e a ocorrência de lesões pulmonares associadas a lesões extrapulmonares em 32% (ATS, 2000; KRITSKI & RUFFINO-NETTO, 2000). Entre as formas extrapulmonares isoladas, a mais freqüente é a forma ganglionar. Nos pacientes com TB pulmonar e infectados pelo HIV, principalmente naqueles na fase avançada de imunodepressão, é menos comum a tosse produtiva e hemoptise e mais freqüente a dispnéia. Estas características clínicas dificultam o diagnóstico clínico e a obtenção de amostras clínicas para exame baciloscópico (KRITSKI *et al.*, 2000). *M. tuberculosis* pode determinar lesões em outros órgãos além do pulmão, entre estes o coração (preferencialmente no pericárdio), a pele, o peritônio, os órgãos genitais, o intestino, as glândulas adrenais, o globo ocular e a laringe.

Os sintomas gerais da TB pulmonar são febre, sudorese, perda ponderal, anorexia e adinamia. Todos estes sintomas e sinais são inespecíficos e podem estar presentes em outras enfermidades pulmonares. Inicialmente, nos pacientes não imunodeprimidos, o sintoma respiratório usualmente referido é tosse acompanhado de expectoração mucopurulenta, às vezes com sangue e dor torácica. Dispnéia é pouco freqüente, ocorrendo apenas nos pacientes com lesões pulmonares mais avançadas e de longa duração. Rouquidão normalmente caracteriza comprometimento da laringe e requer confirmação pelo elevado risco de transmissão aos contatos (KRITSKI *et al.*, 2000; BATISTA *et al.*, 2001).

Nos casos de TB extrapulmonar, entre os pacientes não imunodeprimidos, os sinais e sintomas dependerão do órgão afetado. As localizações mais

freqüentes são a pleura, linfonodos, sistema nervoso central, rins e ossos. Este tipo de TB normalmente apresenta maiores problemas no diagnóstico que a TB pulmonar, pois envolve sítios relativamente inacessíveis e, pela natureza destes, pequenas quantidades de bacilos presentes podem causar sérios danos ao indivíduo infectado. O pequeno número de bacilos presentes na amostra clínica acarreta uma maior dificuldade na identificação bacteriológica sendo que os procedimentos invasivos são, freqüentemente, requeridos para estabelecer o diagnóstico (DYE & FLOYD, 2006; SINGH & ESPITIA, 2007).

1.6 Tratamento

A TB é uma doença grave, porém curável em praticamente 95% dos casos novos, desde que, uma vez diagnosticada a doença, seja utilizado o tratamento antimicrobiano adequado. A quimioterapia é fundamental no controle da TB, pois interrompe a cadeia de transmissão, que são os pacientes bacilíferos. No entanto, é necessário que os fármacos sejam utilizados em esquemas terapêuticos padronizados. Devem ser administrados em combinação de pelo menos 3 fármacos, com ação sobre diferentes sítios de lesão e sobre diferentes fases do metabolismo bacteriano para prevenir o desenvolvimento de resistência. Devem ser prescritos corretamente e administrados regularmente para manter as concentrações necessárias sobre a população bacilar (BRASIL, 1995; IUATLD, 2000).

Fatores como o lento crescimento do *M. tuberculosis*, sua atividade metabólica e a localização celular, determinam que o tempo necessário para a quimioterapia seja prolongado. A população micobacteriana patogênica pode ser dividida em quatro grupos: com metabolismo ativo e crescimento rápido em ambiente aeróbio, com metabolismo semidormente em ambiente intracelular ácido (lisossomo), onde há uma baixa concentração de oxigênio, com metabolismo semidormente em ambiente intracelular não ácido (citoplasma) e com metabolismo extracelular dormente. Este último grupo apresenta uma propriedade única da infecção micobacteriana, onde o microrganismo é capaz de sobreviver quiescente por anos ou décadas (MITCHISON, 1985; GILLESPIE, 2002).

O controle das enfermidades infecciosas em geral está relacionado à melhoria das condições sócio-econômicas da população, melhoria dos sistemas de saúde, programas de vacinação e implantação de um tratamento eficaz. No caso da TB, onde a vacina disponível (BCG) apresenta baixa eficácia para evitar a enfermidade, o correto tratamento assume o duplo papel de curar o enfermo e evitar a transmissão do bacilo, na medida em que ao curar o paciente, rompe-se a cadeia de transmissão (PETRINI & HOFFNER, 1999).

Os antimicrobianos recomendados pela OMS e mais comumente usados para o tratamento da TB em países em desenvolvimento nas Américas são: estreptomicina, etambutol, etionamida, pirazinamida, isoniazida e rifampicina.

No Brasil, desde 1979, o Ministério da Saúde preconiza dois esquemas para tratamento: um de primeira linha, chamado Esquema I, indicado para os casos virgens de tratamento; e um de reserva ou de segunda linha, chamado Esquema III, indicado para pacientes com falência de tratamento no Esquema I. O Esquema I consiste em dois meses de rifampicina, isoniazida e pirazinamida seguidos de quatro meses de rifampicina e isoniazida associadas a mais um antimicrobiano de reserva ou de segunda linha. O Esquema III consiste em três meses de estreptomicina, pirazinamida, etambutol e etionamida seguidos de nove meses de etambutol e etionamida. Para casos de meningocéfalite isolada ou associada a outras formas, é proposto um esquema especial, o Esquema II, que consiste em dois meses de rifampicina, isoniazida e pirazinamida seguidos de sete meses de rifampicina e isoniazida, acrescido de corticoideterapia sistêmica por um período de um a quatro meses no início do tratamento (TUBERCULOSE, 2004; BRASIL, 2005).

Tendo em vista que a resistência primária (paciente infectado por uma linhagem de *M. tuberculosis* já resistente) aos fármacos é considerada baixa no Brasil, o tratamento utilizado deveria proporcionar uma boa eficácia. Porém, a deterioração do sistema de saúde pública do país associada à piora nas condições sócio-econômicas da população tem levado a crescentes taxas de abandono do tratamento, principalmente nos grandes centros urbanos (DALCOLMO *et al.*, 1999). O abandono ou a realização inadequada do tratamento para TB favorecem o desenvolvimento de resistência secundária ou adquirida

(linhagem inicialmente suscetível que se torna resistente por pressão seletiva proveniente da utilização incorreta dos fármacos) (CAMPOS, 1999).

A resistência aos fármacos é definida como a diminuição da sensibilidade *in vitro* de *M. tuberculosis* a um ou mais fármacos utilizados para combater a doença (ROSSETTI *et al.*, 2002). O aumento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes vem se tornando um dos principais problemas no tratamento e combate da TB (SILVA *et al.*, 2003). Tais linhagens são prevalentes em determinadas áreas geográficas ou populações (hospitais, prisões), causando importantes surtos (BLOOM & MURRAY, 1992). Isso é ainda mais grave em pacientes com AIDS, pois como foi mencionado anteriormente, o risco de infecção seguida de adoecimento por TB nestes indivíduos é extremamente elevado. Pacientes com TB causada por linhagens MDR devem ser tratados com regimes terapêuticos contendo fármacos de segunda linha. Pelo menos quatro fármacos a que os microrganismos sejam suscetíveis devem ser utilizadas, o tratamento deve ser dado pelo período mínimo de 18 meses e medidas que assegurem a aderência ao tratamento devem ser tomadas (TUBERCULOSE, 2006).

1.7 Diagnóstico

A falta de um método de diagnóstico rápido e confiável para a TB constitui um sério problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. A detecção da doença na sua fase inicial é de vital importância para o início efetivo do tratamento, evitando assim a utilização inadequada de medicamentos potencialmente tóxicos, como também para interromper a cadeia de transmissão.

O diagnóstico clínico precoce da doença se faz bastante complicado, sobretudo quando a TB ocorre associada a outras enfermidades (infecção pelo HIV, neoplasias malignas, pós-transplantes, etc.), quando então o diagnóstico laboratorial é de extrema importância. Com o advento da infecção pelo HIV, tornou-se mais difícil o diagnóstico da TB, em razão da maior ocorrência de formas clínico-radiológicas atípicas (MELLO *et al.*, 2006).

Na década de 70, aproximadamente 85% dos casos de TB notificados eram limitados ao pulmão, o diagnóstico clínico e radiológico consistia de sinais e sintomas clássicos, e o diagnóstico laboratorial era realizado em 60% a 80% dos casos com o uso da baciloscopia e cultura para micobactéria respectivamente. Esta distribuição proporcional da forma de apresentação da TB mudou substancialmente em pacientes infectados pelo HIV na fase avançada de imunossupressão (AIDS). Nestes pacientes, a TB afeta mais comumente os sítios extrapulmonares, isoladamente ou em associação com as formas pulmonares (JONES *et al.*, 1993). E, mesmo naqueles apenas com a forma pulmonar da TB, o rendimento do diagnóstico laboratorial é inferior, pois a proporção de casos com baciloscopia positiva é entre 20% a 40%, mantendo-se a cultura para micobactérias com rendimento próximo daquele observado entre pacientes não infectados pelo HIV. Ao analisarem tais dados, organizações internacionais passaram a priorizar o desenvolvimento e avaliação de novos testes diagnósticos para a TB, que possam ser úteis em regiões de elevada prevalência de *M. tuberculosis* e HIV (SAMB *et al.*, 1999; HARRIES *et al.*, 2000; WALKER *et al.*, 2000).

Entre os métodos utilizados no diagnóstico da TB podemos citar: os métodos bacteriológicos (baciloscopia e cultura), testes imunossorológicos, métodos radiológicos e os métodos de biologia molecular.

1.7.1 Métodos Bacteriológicos

A TB ativa é diagnosticada pela detecção do bacilo do complexo *M. tuberculosis* em amostras do trato respiratório, no caso da TB pulmonar, ou em amostras de outros sítios, no caso da TB extrapulmonar. Apesar de muitos métodos para o diagnóstico molecular da doença terem sido desenvolvidos nos últimos anos, a baciloscopia e a cultura ainda são o padrão ouro para o diagnóstico da TB ativa, especialmente em países subdesenvolvidos onde muitas vezes estes são os únicos métodos disponíveis para confirmação da doença (WAARD & ROBLEDO, 2007).

1.7.1.1 Amostra

Muitos tipos de amostras clínicas podem ser obtidos para o diagnóstico bacteriológico. Se a suspeita for de TB pulmonar, devem ser coletadas amostras do trato respiratório, como escarro espontâneo, escarro induzido, lavado broncoalveolar ou biópsia pulmonar. No caso do escarro, 3 amostras devem ser coletadas pela manhã em dias alternados, e antes do processamento das amostras o escarro deve ser classificado de acordo com a sua qualidade (FINCH & BEATY, 1997; NELSON *et al.*, 1998; DORRONSORO *et al.*, 2000; YASSIN & CUEVAS, 2003). Nos casos em que o paciente não produz escarro espontaneamente, o mesmo pode ser induzido através da inalação de uma solução salina hipertônica, ou através de broncoscopia (SARKAR *et al.*, 1980; DE GRACIA *et al.*, 1988).

No caso da TB extrapulmonar, a amostra a ser coletada depende do local onde há suspeita de infecção. As amostras mais comuns recebidas em laboratórios são biópsias, aspirados, pus, urina, líquido e líquido pleural, sinovial, peritoneal e pericardial. Nesses casos, a baciloscopia geralmente é negativa e o sedimento obtido dessas amostras é preferencialmente utilizado para a cultura (ESCUDERO-BUENO *et al.*, 1990).

1.7.1.2 Baciloscopia

A baciloscopia direta do escarro é o método básico para o diagnóstico da TB na forma pulmonar. Consiste na visualização microscópica do bacilo da TB após fixação em lâmina e coloração específica do material a ser analisado. O método de coloração específico para micobactérias mais freqüentemente usado é o Ziehl-Neelsen (ZN). Este método está baseado na capacidade das micobactérias em reter a fucsina após descoloração com álcool-ácido devido ao alto conteúdo lipídico da sua parede celular. No microscópio, os bacilos se apresentam como bastonetes ligeiramente delgados, corados em vermelho com fundo azul, sendo, por isso, chamados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (BLOOM, 1994; BRASIL, 2002).

A metodologia é simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo. A baciloscopia disponibiliza uma ampla cobertura diagnóstica, possibilitando a identificação da principal fonte de infecção (pacientes com baciloscopia positiva ou bacilíferos), o que permite a pronta atuação na interrupção da cadeia de transmissão. No entanto, é pouco sensível, e não é específica, uma vez que não é possível distinguir entre as espécies de micobactérias, necessitando que posteriormente seja feita uma diferenciação (STYBLO & ROUILLON, 1981; BROOKS *et al.*, 1995).

O resultado da baciloscopia deve ser dado de acordo com uma escala quantitativa internacional que considera o número de bacilos possíveis de serem visualizados ao microscópio, recomendada pela OMS e pela IUATLD, descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados de baciloscopia sugeridos pela OMS e IUATLD.

| Contagem no Ziehl-Neelsen (1000x) | Resultado |
|--|-------------------------|
| 0 bacilos | Nenhum bacilo observado |
| 1-9 bacilos / 100 campos | Contagem exata |
| 10-99 bacilos / 100 campos | 1 + |
| 1-10 bacilos / campo | 2 + |
| > 10 bacilos / campo | 3 + |

A quantidade mínima de bacilos necessária para ser detectada na baciloscopia é de 5.000 a 10.000 unidades por mL de amostra e sua sensibilidade varia de 50% a 80 % em relação à cultura. Isso significa que um esfregaço negativo não exclui um caso de TB. Esse fato é ainda mais notável quando a infecção ocorre em outros órgãos, onde um número ainda menor de organismos pode causar manifestações clínicas. A sensibilidade da microscopia é baixa principalmente em crianças e em pacientes com AIDS, e sua utilidade depende diretamente da qualidade da amostra de escarro (STEINGART *et al.*, 2006).

Enquanto, aproximadamente, dois terços dos casos de baciloscopia positivos provavelmente permanecem indetectados no mundo, os esforços para controlar a doença encontram-se mais focados em curar os casos de TB do que em detectá-los (DYE *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2004). Apesar do papel do laboratório ser essencial para o diagnóstico e controle da TB, ele não recebe a

devida atenção em países subdesenvolvidos, onde muitas vezes a baciloscopia é o único método disponível para o diagnóstico da doença (WAARD & ROBLEDO, 2007).

1.7.1.3 Cultura para Micobactéria

O isolamento de micobactérias em meio de cultura é um método mais sensível que a baciloscopia tanto para TB pulmonar como para a extrapulmonar, podendo detectar de 10 a 1000 bacilos viáveis por mL de amostra (HOBBY *et al.*, 1973). Um diagnóstico precoce pode ser realizado pela cultura, inclusive nos casos em que o número de bacilos é insuficiente para uma baciloscopia positiva. No entanto, a cultura é indicada para os suspeitos de TB pulmonar persistentemente negativos ao exame direto (baciloscopia), para o diagnóstico de formas extrapulmonares e para os casos de suspeita de resistência bacteriana aos fármacos, quando deve ser realizado o teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) (BRASIL, 2002).

Tradicionalmente, o isolamento através da cultura tem sido realizado em meios sólidos e/ou líquidos. Tais meios são baseados no uso de ovos e altas concentrações de verde de malaquita, como o Löwenstein-Jensen (LJ), que é o mais utilizado, o Ogawa e aqueles que utilizam o ágar, como o meio Middlebrook (7H-10 e 7H-11). Os meios líquidos, como o 7H-9, são mais adequados para repiques de cultivos e estocagem. O crescimento do microrganismo no meio de cultura deve ser observado duas vezes por semana nas quatro primeiras semanas, iniciando entre o terceiro e quinto dia e uma vez por semana até a oitava semana. Geralmente, o crescimento só é detectável a partir da 3ª semana após a inoculação (WAARD & ROBLEDO, 2007).

Uma vez confirmado o crescimento da micobactéria, a mesma deve ser encaminhada para identificação. Apesar de *M. tuberculosis* ser o principal causador da doença em humanos, em algumas áreas geográficas faz-se necessária a identificação da espécie da micobactéria. A mesma pode ser feita através da análise da morfologia da colônia e de provas bioquímicas.

Quando as amostras utilizadas para o cultivo são normalmente contaminadas com outros microrganismos, como no caso de escarro, urina e secreção de cavidade aberta, é necessário eliminar a flora associada, que contamina o meio e impede a multiplicação dos bacilos. O método de descontaminação mais utilizado é o tratamento com hidróxido de sódio e/ou N-acetil-L-cisteína/NaOH (KUBICA & KENT, 1985).

1.7.1.4 Métodos de Detecção do Crescimento Micobacteriano

Embora conhecido há décadas, o meio líquido para o cultivo de micobactérias nunca despertou muito a atenção de micobacteriologistas, e de fato esse tipo de meio é muito suscetível a contaminações por microrganismos de crescimento rápido. Porém, combinando o uso de antimicrobianos com esses meios, tornou-se possível inibir o crescimento de um grande espectro de contaminantes, permitindo a associação do uso dos meios líquidos com a automação para a detecção do crescimento de micobactérias (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

O BACTEC TB 460, foi o primeiro método automatizado para detecção do crescimento das micobactérias e, por muitos anos, o único. Consiste em um sistema radiométrico de cultivo semi-automatizado (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD), baseado na detecção de $^{14}\text{CO}_2$ liberado pelas micobactérias, devido à utilização do ácido palmítico marcado com ^{14}C presente no meio de cultura. A detecção de micobactérias por esse sistema é mais rápida que em meio sólido, levando de 7 a 15 dias dependendo do número de bactérias na amostra analisada. A sensibilidade e especificidade do método são semelhantes àquela obtida pela cultura convencional (BLOOM, 1994). Este método não é mais comercializado.

O BACTEC-MGIT 960 consiste em uma metodologia automatizada, disponibilizado no mercado pela empresa Becton & Dickinson Instruments System. É um método que também utiliza um aparelho semi-automatizado, mas não utiliza material radioativo, pois o meio de cultura líquido (7H-12A e 7H-12B) é feito com base fluorescente. Após 14 dias o crescimento do microrganismo é

medido através de um espectrofotômetro. A metodologia é sensível, porém é onerosa uma vez que depende de um equipamento e reagentes importados. Qualquer tipo de amostra pode ser processada por esta metodologia (HANNA *et al.*, 1999, SOMOSKOVI *et al.*, 2003).

O VersaTREK é comercializado pela empresa Trek Diagnostic Systems, utiliza o meio Middlebrook 7H-9 enriquecido com OADC. Esse sistema monitora a pressão dentro do tubo inoculado. Se há presença de micobactérias viáveis dentro do tubo, o consumo de oxigênio pelo seu metabolismo diminui a pressão interna. Esse sistema não demonstrou vantagens sobre outros métodos de automação e serve preferencialmente para o processamento de sangue e outros líquidos (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

O sistema Bact/Alert 3D possui um sensor de CO₂ no fundo do tubo inoculado que muda da cor verde para amarelo com o CO₂ produzido pelo metabolismo micobacteriano. Essa mudança de coloração altera a intensidade de um raio de luz incidido no fundo do tubo que é captado por um sensor. Este sistema é comercializado pela empresa BioMérieux e preferencialmente deve ser utilizado como amostra sangue ou outros líquidos (TORTOLI & PALOMINO, 2007).

O *Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay* (MODS) é uma metodologia manual realizada em meio líquido (7H-9) em microplacas, que, após 10 dias de inoculação, o fator corda formado pela micobactéria pode ser observado no microscópio invertido com filtro para campo escuro. É uma metodologia simples, fácil de ser implantada num laboratório (PARK *et al.*, 2002).

O método de detecção de microcolônias - *Thin Layer* - é uma metodologia que utiliza meio sólido (7H-11) em placas de Petri, onde é inoculada a amostra clínica. Depois de 10 dias, as microcolônias são observadas no microscópio ótico (MEJIA *et al.*, 1999, PALOMINO & PORTAELS, 2000).

1.7.2 Testes Imunossorológicos

Várias técnicas sorológicas foram propostas para o diagnóstico de TB, como hemoaglutinação, aglutinação em látex, fluorescência indireta,

radioimunoensaio e imunofluorescência, porém, até o momento, nenhuma delas mostrou-se útil do ponto de vista clínico (DANIEL *et al.*, 1987; AL ZAHRANI *et al.*, 2000; HARRINGTON III *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas, o método de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) despertou interesse, pela possibilidade de fácil execução, baixo custo e rapidez diagnóstica nas formas de TB em que a baciloscopia apresenta limitações, como no caso das formas pulmonares paucibacilares e extrapulmonares. Esse método poderia detectar a presença de anticorpos IgG contra antígenos micobacterianos no soro de portadores de TB ativa. Contudo, a especificidade da técnica de ELISA tem sido baixa, pois ela depende do antígeno utilizado, e o *M. tuberculosis* apresenta estruturas antigênicas comuns a outras espécies de micobactérias não patogênicas (inclusive comuns ao *M. bovis* BCG). Os pacientes infectados pelo HIV, principalmente nas fases avançadas de imunossupressão, apresentam também baixo rendimento na técnica de ELISA, em razão da baixa produção de anticorpos ou de sua atividade policlonal inespecífica (BERLIE *et al.*, 1991; BARRERA *et al.*, 1992; MARTIN-CASABONA *et al.*, 1992; HARRINGTON III *et al.*, 2000).

1.7.2.1 Prova Tuberculínica

A prova tuberculínica, analisada através da técnica de Mantoux, é utilizada como método auxiliar de diagnóstico da TB. Esta técnica existe há mais de 100 anos e foi muito pouco modificada nos últimos 60 anos. Ela é baseada na reação celular desenvolvida pelo indivíduo exposto ao bacilo, mediante a inoculação intradérmica de um derivado protéico de *M. tuberculosis* (tuberculina). A tuberculina é preparada a partir de um filtrado de cultura do bacilo da TB através da precipitação protéica. A técnica de purificação foi proposta por Siebert, que obteve um produto que denominou PPD (*purified protein derivative*) (EDUARDS & EDUARDS, 1960). Os constituintes do PPD são, na sua maioria, pequenas proteínas com peso molecular de aproximadamente 10.000 Da, mas também existem polissacarídeos e alguns lipídios presentes (DANIEL, 1980; ATS, 2000). A tuberculina atualmente utilizada na maioria dos países em desenvolvimento é o

PPD RT23, preconizada pela OMS. O teste intradérmico de tuberculina causa uma infiltração nodular, plana e irregular, acompanhada de área eritematosa (avermelhada) de extensão mais ou menos delimitada, entre 48 e 72 horas após a sua aplicação. Em estudos epidemiológicos de campo, este teste cutâneo permite uma detecção da prevalência estimada de infecção tuberculosa em uma determinada população, entretanto não é capaz de distinguir entre infecção recente ou remota e entre infecção causada por linhagens de micobactérias não tuberculosas. Além disso, o teste tem um valor limitado para o diagnóstico da tuberculose clínica (BATISTA *et al.*, 2001).

Nos estudos que utilizaram a prova tuberculínica, foi relatada uma taxa de 25% de resultados falso-negativos em pessoas com tuberculose ativa, sendo esta taxa maior em indivíduos imunodeprimidos (HOLDEN *et al.*, 1971). A alta porcentagem de resultados falso-negativos parece estar relacionada à desnutrição grave (perda de mais de 15% do peso corporal habitual), doenças agudas graves e imunossupressão. A vacinação com vírus atenuado pode causar a supressão da resposta ao PPD em pacientes com comprovada infecção com *M. tuberculosis*. Testes falso-positivos ocorrem em indivíduos que são infectados com outras micobactérias, incluindo a vacinação recente com BCG (DANIEL & JANICKI, 1978; HARBOE, 1981).

1.7.2.2 Interferon Gamma Release Assay

Na última década, testes imunossorológicos para detectar a presença de TB latente têm despertado o interesse dos pesquisadores, uma vez que, de todos os indivíduos infectados com *M. tuberculosis* entre 5% a 10% desenvolverão a doença ao longo da vida e o restante irá se manter como um reservatório de infecção e transmissão da TB. Estes testes, chamados de IGRA (Interferon Gamma Release Assay) baseiam-se na detecção do Interferon gama (INF- γ) (PAI *et al.*, 2004a).

Atualmente, há dois testes para diagnóstico de infecção por TB latente licenciados para distribuição comercial em alguns países, o QuantiFERON (QFT)-TB Gold (Cellestis, Victoria, Austrália), que utiliza a ligação de uma enzima para

medir a produção do antígeno específico do INF- γ de células T circulantes no sangue total, e o T-SPOT.TB (Immunotec Oxford, Oxford, Reino Unido), que mede a quantidade de células mononucleares do sangue periférico que produzem INF- γ . Ambos os testes fazem uso de antígenos mais específicos para *M. tuberculosis* do que o PPD, como o ESAT-6, PCP-10, e TB7-7 (MAZUREK *et al.*, 2005; MENZIES *et al.*, 2007).

As vantagens do IGRA é que exige apenas uma visita do paciente, não é realizado *in-vivo*, como o PPD, o que reduz o risco de efeitos adversos e possui ótima especificidade, uma vez que não é afetado pela vacina BCG (MENZIES *et al.*, 2007).

1.7.3 Métodos Radiológicos

Em países desenvolvidos, o exame radiológico do tórax é usualmente o primeiro método de diagnóstico utilizado após o exame físico. A TB pulmonar quase sempre causa anormalidades observadas na forma de opacidades nas imagens. Com a freqüente associação com o HIV, a radiologia do tórax passa a ter um importante papel na diferenciação de formas de TB e no diagnóstico de outras pneumopatias. Em pacientes HIV positivos, a natureza dos achados radiológicos depende do grau do imunocomprometimento produzido pela infecção. Assim sendo, na fase inicial do curso da infecção pelo HIV, tende a ocorrer um achado radiológico típico da TB pulmonar pós-primária no adulto, com imagens de hipotransparência heterogênea, com ou sem cavidades, no terço superior dos pulmões. Enquanto que na infecção pelo HIV na fase mais avançada, os achados radiológicos pulmonares são mais atípicos, com maior freqüência de imagens difusas, não cavitárias, com linfonodomegalia hilar e/ou mediastinal e, em 10% dos casos, sem alteração no radiograma torácico (BRASIL, 1995, BLOOM, 1994; KRITSKI *et al.*, 2000).

1.7.4 Métodos Moleculares

Em razão dos aspectos descritos anteriormente, é consenso de que torna-se prioritário o desenvolvimento e avaliação de métodos diagnósticos rápidos para a TB. Nos últimos anos, ocorreram alguns avanços importantes na área diagnóstica de várias enfermidades, infecciosas ou não.

A partir de 1989, técnicas de biologia molecular foram introduzidas para a detecção de *M. tuberculosis* em amostras clínicas. Os métodos de amplificação de ácidos nucleicos (AAN) têm demonstrado um potencial na detecção rápida da micobactéria, tanto em meios de cultura como em amostras clínicas. Entre eles, o mais utilizado tem sido a PCR. Esta técnica baseia-se na amplificação de regiões específicas do DNA do agente infeccioso, no caso da TB, o *M. tuberculosis*, sendo a sua alta sensibilidade e especificidade a principal vantagem no processo de detecção (ANDERSEN & HASSEN, 1989; BRISOON-NOEL *et al.*, 1989).

Vários testes para o diagnóstico de TB por PCR têm sido descritos, tanto métodos *in house* como kits comerciais. Os métodos *in house* são padronizados nos diversos laboratórios de pesquisa e diferem entre si pela utilização de distintas seqüências de nucleotídeos para a amplificação e diferentes métodos de preparação da amostra e detecção dos fragmentos amplificados na reação de PCR. Os kits comerciais são produzidos em larga escala e se caracterizam pela elevada reprodutibilidade (DROBNIEWSKI *et al.*, 2003).

1.7.4.1 Métodos Comerciais

Nos últimos anos, muitos métodos de ANN têm sido comercializados, porém, somente três encontram-se mundialmente difundidos e têm sido amplamente avaliados em estudos internacionais e meta análises, o E-MTD (AMTDT/Gen-Probe Inc., San Diego, Calif.), o Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor; Roche Diagnosis Systems, Inc., Branchburg, NJ) e o BD ProbeTec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD).

Inicialmente, os dois primeiros testes foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) somente para a utilização em amostras clínicas pulmonares

com baciloscopia positiva, mas, em 1999, uma nova versão do teste MTD (MTD II) foi aprovada para a utilização em amostras de pacientes suspeitos de TB pulmonar com baciloscopia positiva e negativa (DROBNIEWSKI *et al.*, 2003). O BD ProbeTec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD) ainda não possui aprovação pelo FDA. No Brasil, atualmente apenas um kit possui registro junto a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor; Roche Diagnosis Systems, Inc., Branchburg, NJ) (ANVISA, 2008).

O teste E-MTD (AMTDT/Gen-Probe Inc., San Diego, Calif.), baseado no sistema de amplificação mediado por transcrição reversa, utiliza a região 16S do RNA ribossomal (rRNA), específica do complexo *M. tuberculosis*, como alvo da detecção. Isso torna o teste mais sensível, uma vez que o número de rRNAs é de aproximadamente 2.000 cópias por célula. O teste utiliza uma sonda de DNA marcada com um éster de acridina através de uma hibridização feita em placas de ELISA. O processo é isotérmico, o que dispensa o uso de termocicladores, necessitando apenas de um luminômetro fornecido pelo fabricante. A reação é desenvolvida em um único tubo, o que ajuda a evitar problemas de contaminação cruzada. O procedimento pode ser realizado em 2 h e 30 min. Este kit não possui controle interno para avaliar a possível presença de inibidores. A sensibilidade deste teste varia entre 91,7% e 100% em amostras com baciloscopia positiva e de 65,5% a 92,2% em amostras com baciloscopia negativa (CHEDORE & JAMIESON, 1999; ALCALÁ *et al.*, 2001; WOODS *et al.*, 2001; CHEDORE & JAMIESON, 2002; O'SULLIVAN *et al.*, 2002; PIERSIMONI & SCARPARO, 2003).

No teste Amplicor (Roche Diagnostic Systems, Inc., Somerville, N.J.), o DNA da micobactéria é amplificado com *primers* específicos da região do gene que codifica o rRNA 16S. Após a amplificação, os amplicons marcados com biotina são colocados em uma placa de ELISA contendo uma sonda específica ligada à parede da placa. Os DNAs que hibridizam com a sonda são reconhecidos por um conjugado de avidina-peroxidase (que se liga à biotina). Os produtos desta ligação são então detectados pela coloração que é produzida quando a peroxidase reage ao seu substrato. A intensidade da cor deve ser medida em fotômetro. Neste teste, os resultados falsos positivos produzidos por contaminações com *amplicons* podem ser reduzidos pelo uso de dUTP e da

uracil-N-glicosilase. O teste pode ser desenvolvido em 6 h e 30 min. Este kit possui um controle interno com regiões de anelamento idênticas às do DNA alvo. Quando não há amplificação deste controle interno, significa que há presença de substâncias inibidoras da reação de amplificação. A especificidade deste teste é próxima a 100% e a sensibilidade varia entre 90% a 100% em amostras com baciloscopia positiva e entre 50% e 95,9% em amostras com baciloscopia negativa (EING *et al.*, 1998; RAJALAHTI *et al.*, 1998; REISCHL *et al.*, 1998; SHAH *et al.*, 1998; MITARAI *et al.*, 2000; BOGARD *et al.*, 2001; GOMEZ-PASTRANA *et al.*, 2001; PIERSIMONI & SCARPARO, 2003).

No teste BD ProbeTec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD), a região alvo é o elemento de inserção IS6110, específico do complexo *M. tuberculosis*. Durante a fase exponencial da amplificação, uma sonda marcada com dois fluoróforos é hibridizada ao produto amplificado. Um dos fluoróforos é liberado e a fluorescência emitida é captada em tempo real. Este procedimento leva em torno de 4 horas para ser realizado e possui um controle interno através do qual pode-se saber caso não esteja ocorrendo amplificação. A sensibilidade deste teste varia entre 98,5% e 100% para amostras com baciloscopia positiva e de 0,33% a 100% em amostras com baciloscopia negativa (BERGMANN & WOODS, 1998; BERGMANN *et al.*, 2000; BARRETT *et al.*, 2002; JOHANSEN *et al.*, 2002; MAUGEIN *et al.*, 2002; PIERSIMONI *et al.*, 2002; MAZZARELLI *et al.*, 2003).

Resultados positivos de métodos baseados na amplificação de rRNA podem estar fortemente relacionados com a presença do organismo vivo. O RNA, sendo mais lábil que o DNA, dificilmente permanecerá intacto após a morte celular, permitindo o monitoramento do tratamento (SHAH *et al.*, 1995).

1.7.4.2 Métodos *in house*

Além dos testes comerciais, alternativas diagnósticas de custo mais baixo (técnicas *in house*) têm sido descritas com rendimentos promissores entre as amostras com baciloscopia negativa, porém para serem disponibilizadas na rotina necessitam de estudos de validação interlaboratorial e análises de custo-efetividade (ROSSETTI *et al.*, 1997; SPERHACKE *et al.*, 2004). A maioria dos

ensaios padronizados em laboratório (*in house*) utiliza a PCR como estratégia. De maneira geral, a diferença entre os métodos *in house* reside na região de amplificação, no preparo da amostra e na detecção dos fragmentos amplificados.

Algumas revisões (ATS, 2000; DROBNIIEWSKI *et al.*, 2003; FLORES *et al.*, 2005) e estudos interlaboratoriais (NOORDHOEK *et al.*, 1994; NOORDHOEK *et al.*, 1996; NOORDHOEK *et al.*, 2004) têm apontado para a grande variabilidade na sensibilidade e especificidade em diferentes estudos utilizando a PCR. As explicações para estas diferenças incluem os diferentes processos de descontaminação das amostras, a contaminação cruzada, a inibição, o erro de amostragem, a qualidade do padrão ouro, e a análise de amostras respiratórias e não respiratórias (SARMIENTO *et al.*, 2003).

1.7.4.2.1 Extração e Purificação de DNA

Um fator muito importante para a elevada acurácia (sensibilidade e especificidade) da PCR é o método utilizado na preparação da amostra clínica, o qual pode influenciar, principalmente, nos resultados referentes à sensibilidade da técnica. Isso inclui a forma de extração do DNA (lise celular e purificação).

Em todos eles, a primeira etapa da preparação da amostra consiste em romper a célula bacteriana causando a liberação do DNA de seu interior. A segunda etapa na preparação da amostra consiste em purificar o DNA, que possivelmente esteja presente, removendo substâncias encontradas usualmente em materiais clínicos, que podem atuar como inibidores da enzima DNA polimerase no processo subsequente de amplificação, como heparina, hemoglobina, etanol, fenol, SDS, EDTA, acetato de sódio entre outros (VALENTINE-THON, 2002).

Entre os vários protocolos de extração de DNA de amostras clínicas, foram descritos: lise celular com SDS (THIERRY *et al.*, 1990; ALDOUS *et al.*, 2005; TAKAHASHI & NAKAYAMA, 2006), Proteinase K (HONORÉ-BOUAKLINE *et al.*, 2003), Tween 20 (BRISSON-NOEL *et al.*, 1991; FOLGUEIRA *et al.*, 1993), Triton X-100 (SHAWAR *et al.*, 1993; ALDOUS *et al.*, 2005; CHAKRAVORTY *et al.*, 2005), Nonidet P40 (ZAMBARDI *et al.*, 1993; QUEROL *et al.*, 1995) e Tiocianato

de Guanidina (BOOM *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1993). Em alguns protocolos, além dos tampões de lise contendo algumas dessas substâncias, as amostras ainda podem ser incubadas a temperaturas elevadas (75-100°C) com a finalidade de se obter lise térmica das células (ROSSETTI *et al.* 1997; SPERHACKE *et al.*, 2004; ALDOUS *et al.*, 2005; CHAKRAVORTY *et al.*, 2005; SCHERER *et al.*, 2007). A alternância de temperaturas extremas como congelamento rápido em nitrogênio líquido com posterior fervura, foi relatada (TREWICK & DAERDEN, 1994), como também o rompimento da parede celular através de processos mecânicos utilizando partículas de vidro (SANTOS *et al.*, 1992) ou partículas de zircônio (KOX *et al.*, 1994). Também há referências ao uso de ultra som para a lise bacteriana (FOLGUEIRA *et al.*, 1993; NOLTE *et al.*, 1993).

Em um estudo de meta análise foi relatado que em torno de 65% dos estudos a extração de DNA é realizada através da utilização de meios químicos, enquanto que em aproximadamente 35% são utilizados meios físicos (FLORES *et al.*, 2005).

Para a purificação do DNA, os métodos descritos na literatura variam, desde utilizar o DNA sem qualquer tratamento de purificação (KOGACÖZ *et al.*, 1993; SHAWAR *et al.*, 1993) até adicionar substâncias capazes de purificar o DNA como fenol/clorofórmio ou clorofórmio/álcool isoamílico e, posteriormente, concentrá-lo com diferentes concentrações de álcool (COUSINS *et al.*, 1992; NOLTE *et al.*, 1993; TAKAHASHI & NAKAYAMA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2008). Entre outros procedimentos foi descrita a utilização de partículas de sílica (BOOM *et al.*, 1990; ROSSETTI *et al.*, 1997; SPERHACKE *et al.*, 2004; CHAKRAVORTY *et al.*, 2005; SCHERER *et al.*, 2007) e sacarose (VICTOR *et al.*, 1992) no processo de purificação.

1.7.4.2.2 Reação de Amplificação

Na técnica de PCR, a escolha da região a ser amplificada é importante para definir a especificidade da reação. Diferentes seqüências de *primers* têm sido utilizadas para a amplificação de regiões de genes específicos do complexo *M. tuberculosis*.

Inicialmente, foi utilizada a seqüência de 385 pb presente no gene que codifica uma proteína de 65 kDa do *M. tuberculosis* (BRISSON-NOEL *et al.*, 1989). Esse gene, codificador de um antígeno bacteriano, está presente em cópia única nos genomas de *M. bovis*, *M. avium*, *M. paratuberculosis* e *M. fortuitum*. Também foi relatada a amplificação da região gênica de 332 pb que codifica uma proteína antigênica de 38 kDa (específica do *M. tuberculosis* e *M. bovis*) (ANDERSEN & HANSEN, 1989; SJÖBRING *et al.*, 1990). O gene que codifica a proteína MPB64 de *M. bovis* também foi utilizado como alvo para a amplificação de um fragmento de 240 pb (MANJUNATH *et al.*, 1991). Foi relatada a utilização da seqüência de DNA de 396 pb responsável pela codificação da proteína MTP 40 como alvo de amplificação, considerada específica para *M. tuberculosis* (HERRERA e SEGOVIA, 1996; WEIL *et al.*, 1996). Posteriormente, houve relato de que esta seqüência não fora identificada em alguns isolados de *M. tuberculosis* (WEIL *et al.*, 1996). Também estão descritas regiões codificantes para uma proteína de antígeno de 32 kDa (SOINI *et al.*, 1996), para as proteínas MPB70 (COUSINS *et al.*, 1992) e MPB64 (TAKAHASHI & NAKAYAMA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2008). Fragmentos de DNA que codificam uma região do gene do RNA ribossomal 16S (rRNA) também foi considerado alvo de ampliações pela técnica de PCR (DEL VECHIO *et al.*, 1994).

Uma das regiões “alvo” mais utilizadas é a seqüência de inserção de DNA (IS6110) repetitiva e específica do complexo *M. tuberculosis*. Esta seqüência de inserção está repetida de 1 a 20 vezes no genoma bacteriano conferindo uma maior sensibilidade aos testes que utilizam essa região para a amplificação (ROSSETTI *et al.*, 1997; SPERHACKE *et al.*, 2004; ALDOUS *et al.*, 2005; CHAKRAVORTY *et al.*, 2005; KIBIKI *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007; SCHERER *et al.*, 2007).

1.7.4.2.3 Detecção do Produto Amplificado

A detecção do produto amplificado também possui uma considerável influência na sensibilidade da técnica. Os protocolos podem ser realizados através de procedimentos como a eletroforese em gel de agarose corado com brometo de

etídio (KOX *et al.*, 1994, QUEROL *et al.*, 1995; CONDOS *et al.*, 1996; ROSSETTI *et al.* 1997; CHAKRAVORTY *et al.*, 2005); o gel de poliacrilamida (VICTOR *et al.*, 1992); ou hibridização dos fragmentos amplificados com sondas específicas. A detecção por hibridização pode ser realizada pelo uso substâncias que podem ser incorporadas às moléculas de DNA, tais como a biotina (ANDERSEN *et al.*, 1993; SPERHACKE *et al.*, 2004; SCHERER *et al.*, 2007) e a digoxigenina (WILSON *et al.*, 1993; KOX *et al.*, 1996). A hibridização com estes marcadores pode ser detectada com estreptavidina e anticorpos ligados a uma enzima (normalmente fosfatase alcalina ou peroxidase). A reação com o substrato da respectiva enzima, produz luminescência detectável em filmes de raio X ou coloração visualizada ou medida quantitativamente em espectrofotômetro.

As etapas de hibridização podem ser realizadas em membranas de náilon ou nitrocelulose em experimentos de *Southern blotting* (SPERHACKE *et al.*, 2004; SCHERER *et al.*, 2007), bem como em microplacas (WILSON *et al.*, 1993; CHO *et al.*, 1995; KOX *et al.*, 1996). A visualização colorimétrica em membrana tem a vantagem de proporcionar um resultado baseado na presença e ausência de cor. Já em microplacas, há a vantagem do resultado ser semi-quantitativo, dado através da leitura em espectrofotômetro, não dependendo de interpretação subjetiva (KOX *et al.*, 1996).

A detecção da amplificação também pode ser feita através de PCR em tempo real. Neste tipo de detecção, a amplificação é quantitativamente medida através da captação de um sinal de fluorescência emitido a cada ciclo de amplificação (ALDOUS *et al.*, 2005; TAKAHASHI & NAKAYAMA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2008)

1.7.4.3 Aplicação Clínica do Diagnóstico Molecular

Para que a técnica da PCR seja executada com sucesso no diagnóstico de doenças, precauções rigorosas são essenciais e devem ser adotadas a fim de evitar resultados falso-positivos e falso-negativos. Principalmente no caso da TB, em que o tratamento, além de longo, pode causar ao paciente uma série de efeitos adversos desagradáveis e um paciente com TB ativa, se não tratado pode

infectar de 10 a 15 pessoas em um ano. Para tanto, é necessária a utilização de controles em todas as etapas do processo para confirmar a obtenção adequada do DNA da amostra clínica, a eficácia da reação de PCR e a ausência de contaminação cruzada com DNA ou produto amplificado de *M. tuberculosis* nos reagentes (BARNES & BARROWS, 1993; NOORDHOEK *et al.*, 1996; BENNEDSEN *et al.*, 1996). Os testes de AAN podem, sem dúvida, contribuir para a um diagnóstico mais efetivo e em menos tempo. No entanto, principalmente em países de elevada prevalência de TB, de TB associada ao HIV e de micobacterias atípicas, a interpretação dos resultados deve ser realizada com cautela, sem substituir a baciloscopia e a cultura (importante para a identificação da espécie e teste de sensibilidade). Quando a microscopia e os testes de AAN discordarem, as evidências clínicas devem ser consideradas e os testes devem ser repetidos. Ou seja, os testes de AAN devem ser sempre desenvolvidos junto com os testes bacteriológicos e na análise do resultado laboratorial, os dados clínicos são imprescindíveis (WATTERSON & DROBNIOWSKI, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter um método de diagnóstico colorimétrico semi-quantitativo para TB ativa utilizando a técnica de PCR e detecção de DNA em microplacas, visando simplificar etapas e tornar o teste adequado para a utilização em rotinas de laboratório.

2.2 Objetivos Específicos

- Seleção de amostras para composição de um banco de amostras clínicas;
- Padronização de um protocolo para extração e purificação de DNA;
- Padronização de um protocolo para detecção colorimétrica semi-quantitativa dos produtos amplificados obtidos através da PCR;
- Validação laboratorial para determinação da acurácia da técnica desenvolvida utilizando como padrão ouro a associação da baciloscopia com a cultura;

3. MANUSCRITO

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA by microwell plate hybridization assay

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA by microwell plate hybridization assay

Candice Tosi Michelin^{1,2}, Franciele Rosso^{1,2}, Karen Schmid¹, Rosa Dea Sperhackle³, Martha Maria Oliveira⁴, Afrânio Lineu Kritski⁴, Leonides Rezende Jr.⁵, Arnaldo Zaha², Maria Lucia Rosa Rossetti^{1,2,6}

¹ Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

³ Laboratório de Pesquisa em HIV/AIDS (LPHA), Universidade de Caxias do Sul (UCS), Brazil

⁴ Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil

⁵ Ampligenix Biotech, Brazil

⁶ Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Brazil

*Corresponding author: Maria Lúcia R. Rossetti, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, CDCT/FEPPS; Av. Ipiranga 5400, CEP 90610-000 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone/Fax: 55 51 33520336 Email: mrossett@terra.com.br

Abstract: A method to purify *Mycobacterium tuberculosis* DNA and its detection using a microwell hybridization assay was standardized. Three hundred and three samples of induced sputum were tested and the sensitivity and specificity obtained were 88% and 98% respectively.

Keywords: Tuberculosis, Microwell Plate Hybridization Assay, IS6110, Molecular Diagnosis

Tuberculosis (TB) is one of the most important health problems in the world. The World Health Organization (WHO) reported 9.2 million new TB cases with 1.7 million deaths in 2006 (WHO Report, 2008). If not treated, each person with pulmonary TB infects on average 10 to 15 people every year (WHO Report, 2007). In most low-income countries, TB diagnosis depends on expectorated sputum microscopy and culture, although, the first lacks sensitivity and the second is time consuming (Kent et al., 1985). It is estimated that approximately 30% of adult patients with suspected pulmonary TB do not produce sputum spontaneously or have negative acid fast bacilli smears. Diagnosis of TB in these patients is difficult and in most cases they are treated empirically based on clinical and chest radiograph findings. However, therapy based only on clinical and radiographic findings may result in the inappropriate administration of anti-tuberculosis drugs to patients with diseases other than TB, especially among immunosuppressed subjects. Induce sputum evaluation has been proposed for the smear negative pulmonary TB patients or for those that cannot produce sputum, spontaneously, but remains with low sensitivity on sputum microscopy (Conde et al., 2000). Many new molecular techniques have been developed for TB diagnosis, including commercially available kits and in-house methods, among them, nucleic acid amplification (NAA) has been shown to be a very rapid and sensitive method (Ling et al., 2008; Greco et al., 2008). Nevertheless, many problems have been described using in house methodologies, including low reproducibility, depending on the type and quality of clinical specimen, DNA extraction procedures among other factors, and subjective readings of the results (Kox et al., 1996). Our group has developed and evaluated in-house PCR using *IS6110* as a target and agarose gel electrophoresis and membrane hybridization procedure to detect *M. tuberculosis* (Rossetti et al., 1997; Sperhackle et al., 2004). The present study describes the improvement of an analysis to purify *M. tuberculosis* DNA and a semi-quantitative method for its detection using a microwell hybridization assay.

Three hundred and three induced sputum samples from 303 pulmonary TB suspects were prospectively evaluated at Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - HUCFF, Unidade de Pesquisa em Tuberculose – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Initially, the samples were processed with 2% N-acetyl-L-

cysteine/1 M NaOH. All samples were stained of acid-fast bacilli (AFB) and cultured, and this association was used as gold standard. The DNA extraction was standardized as described by Boom et al. (1990), with modifications. The samples were concentrated by centrifugation at 13.000 rpm for 10 min and the supernatant were disposed of by suction. One hundred μL of a lysis buffer containing guanidine hydrochloride 8 M, Tris HCl 0.08 M, EDTA 0.04 M and Triton X-100 were added and the samples were vortexed to homogeneity. After 10 min of incubation at 100°C, the samples were centrifuged for 1 min at 13.000 rpm and the supernatant were transferred to a vessel containing 2.5 μL of silica suspension and vortexed to homogeneity. The suspension of silica particles was prepared for DNA purification according to Boom et al (1990). After 1 min centrifugation at 13.000 rpm, supernatant was disposed of by suction and the pellet was washed twice with a buffer containing guanidine hydrochloride 8 M and Tris HCl 0.08 M, and once with ethanol 70%. After disposal of the ethanol, the vessels were dried at 56°C with closed lids in a heath block for 10 min and with open lids inside a NB2 cabinet at room temperature for 5 min. A TE 1X elution buffer were added, the vessels were vortexed briefly and incubated for 10 min at 56°C. After 1 min centrifugation at 13.000 rpm, the supernatant was collected for further experimentation.

The amplification reactions were performed with biotinylated primers derived from the *IS6110* insertion element sequence, described by Hermans et al. (1990). The amplification was carried out (30 cycles of 2 min at 94°C, 2 min at 68°C and 2 min at 72°C) in an automated thermal cycler (PTC 150 Mini Cycler, MJ Research, Watertown, MA, USA). The generated amplified fragment was 245 bp in size (Hermans et al., 1990).

The detection of amplified fragments was performed using microwell plates (Nunc Immobilizer™ Amino Surface, Nunc A/S, Roskilde, Denmark). The aminated probe used (5'amine TTTTTTTTTTGTCCCGTCCCGCCGATCTC3') was complementary to an internal region of the amplified fragment. Plates were prepared for the detection by the addition of 100 μL of a solution containing 100 mM of Sodium Carbonate pH 9.6 and 100 μg of the aminated probe to each well and incubation for 24 h at 2-8°C. The wells were aspirated and washed three times with a PBST solution (Nunc Immobilizer™ Amino Instruction Protocol, 2005).

The amplified material was boiled to denature the DNA product and the tubes were chilled on ice. To each well, 100 µL of hybridization buffer (SSC 5X, 0.5% BSA, 0.1% Tween 20) and 15 µL of the amplified product were added and the plate was incubated at 50°C for 45 min. The wells were washed three times with SSC 0.5X and 0.1% Tween 20, soaked for 15 min at 50°C with a pre-heated solution, and washed three times again with the same solution. Then, 100 µL of streptavidin conjugated to horseradish peroxidase were added and incubated for 30 min at 37°C. The wells were washed three times with Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM and 0.1% Tween 20, soaked for 5 min at room temperature and washed three times again with the same solution. Then, 100 µL of TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) were added. After 15 min at room temperature, 100 µL of a 0.1 M sulphuric acid solution were used to stop the colour development. The results were read in an ELISA reader at 450nm with a 620nm re-filter (Nunc Tech Note, 1999a, Nunc Tech Note, 1999b).

Positive controls were used in DNA extraction (a dilution of *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 bacilli containing 50 colony forming units) (Sperhake et al., 2004). The positive amplification control was a pAMP-1 plasmid containing a 245 bp inserted fragment from *IS6110* sequence (Cortez-Herrera et al., 2008). A cut-off for the readings were pre-established at 0.250 based on the analysis of 120 clinical samples negative for tuberculosis by microscopy and culture analyses. The grey zone was established between 0.225 and 0.275. All the tests were made in a blinded fashion.

To the samples with negative readings, 10 fg of an internal control (pAMP-1 plasmid containing a 664 bp inserted fragment) was added to the PCR to evaluate the presence of inhibitors (Cortez-Herrera et al., 2008). The sequence added was amplified in the same conditions and with the same primers of the 245 bp fragment, but it generates a fragment of 664 bp. These results were visualized by electrophoresis on a 1,5% agarose gel stained with ethidium bromide.

| Test | Smear | | Culture | | Smear and/or Culture | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------------------|----------|
| | Positive | Negative | Positive | Negative | Positive | Negative |
| Positive | 54 | 10 | 54 | 10 | 57 | 5 |
| Negative | 8 | 225 | 8 | 225 | 8 | 227 |
| Total | 62 | 235 | 62 | 235 | 65 | 232 |

Table 1 PCR results of 297 induced sputum specimens analyzed with microwell plate hybridization assay

From the 303 induced sputum samples analyzed, 69 had positive result for culture or microscopy (6 only microscopy positive, 9 only culture positive and 54 positive for both) while 234 were negative for both. From the 69 positive samples, 3 showed inhibition in the PCR reaction, 1 had the reading in the grey zone and 57 showed positive result in our test while 8 (positive for microscopy and culture) had negative readings. From the 234 negative samples, 2 showed readings in the grey zone, 227 had negative result in our test and 5 had positive readings. The inhibited samples and the ones with reading in the grey zone were excluded from the analysis. After the analysis, the sensitivity and specificity were calculated at 88% (CI 85.3%, 76.7%-93.9%) and 98.0% (CI 97.8%, 95.9%-93.9%) respectively. There was no significant difference in the overall performance of gold standard and the developed method ($P=0.302$). The value of kappa score obtained was 85% and PPV and NPV were 92% and 97%, respectively.

Among the 303 samples included in this study, an amount of 31 samples were also processed using the Roche AMPLICOR MYCOBACTERIUM system (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA). From these samples, 10 were positive in culture or microscopy (1 only microscopy positive, 6 only culture positive and 3 positive for both) and 21 were negative for both. From the 10 positive samples, 9 showed positive and 1 negative results using the Roche AMPLICOR MYCOBACTERIUM system, the same result was obtained using our test. From the 21 negative, 19 showed negative and 2 positive results using Roche AMPLICOR MYCOBACTERIUM system, while all the 21 samples had negative readings in our test.

The overall sensitivity and specificity results obtained in this study are in agreement with the findings in other studies (Pai et al., 2003; Ling et al., 2008; Piersimoni et al., 2003). A recent meta-analysis evaluated diagnostic accuracy for pulmonary TB stratified by smear status and it concluded that the low sensitivity of smear-negative patients precludes the use of nucleic acids amplification (NAA) tests for ruling out TB. Its high specificity in this group of patients, however, is useful for ruling in TB (Greco et al., 2008). Lack of rapid and accurate diagnostics for TB has been a major concern for global TB control. The most notable advantage of nucleic acids amplification tests is their rapid turn-around time, which

may have important implications for patient management and TB control. However, its specificity appears maximized at the cost of sensitivity. Reasons to account for their low sensitivity include low concentration of bacilli, such as smear-negative sputum specimens like induced sputum samples included in this study, or the presence of inhibitory substances (Woods, 2001).

The hybridization assay was selected due to its simple method and the colorimetric end point, all factors that might be expected to facilitate the transfer of NAA tests to laboratories in low income countries (van Cleeff et al., 2005; Dowdy et al., 2003). Since home-made NAA is less costly than automated ones, this test could be introduced more widely after a proper evaluation of its cost-effectiveness with clinical and radiographic characteristics to refine estimates of likelihood of TB disease in different settings (van Cleeff et al., 2005; Lim et al., 2000). Furthermore, study results may be influenced by the reference standard used to compare test results. The lack of a diagnostic gold standard remains one of the major obstacles for evaluating new diagnostics. There is a high degree of variability in accuracy across studies using NAA tests, thus, they still cannot replace culture and microscopy but should be interpreted along with conventional tests and clinical data for diagnosing TB (Pai et al., 2003; Pai, 2004; Piersimoni et al., 2003).

References

- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E, Van Der Noordaa, J., 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids, *J Clin Microb*, Vol. 28, pp. 495-503.
- Conde MB; Soares SLM, Mello FCQ, Rezende VM, Almeida LL, Daley CL, Kritski A. The usefulness of induced sputum (IS) for diagnosis of pulmonary tuberculosis in AIDS reference Center, in Brazil. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000 162 (6): 2238-2240)
- Cortez-Herrera, E., Sperhacker, R.D., Becker, D., Kritski, A., Zaha, A., Rossetti, M.L.R., 2008. Internal Control in PCR for *Mycobacterium tuberculosis*: Usefulness and Improvement of the Diagnosis. *Braz Arch Biol Technol*, Vol. 51(4), pp 485-491.
- Eisenach, K.D., Cave, M.D., Bates, J.H., Crawford, J.T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium*

- tuberculosis, 1990. *J Infect Dis* Vol. 161, pp. 977-981.
- Dowdy, D.W., Maters, A., Parrish, N., Beyrer, C., Dorman, S.E., 2003. Cost-effectiveness analysis of the gen-probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test as used routinely on smear-positive respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, Vol. 41(3), pp. 948-953.
- Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing: WHO report 2008.
- Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing: WHO Report 2007.
- Greco, S., Girardi, E., Navarra, A., Saltini, C., 2008. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis, *Thorax* Vol. 61, pp. 783–790.
- Hermans, P.W.M., van Sooligen, D., Dale, J.W., Schuitema, A.R.J., McAdam, R.A., Catty, A., van Embden, J.D.A., 1990. Insertion Element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a Useful Tool for Diagnosis and Epidemiology of Tuberculosis, *J Clin Microb*, vol. 28, No. 9, pp. 2051-2058
- Kent, P.; Kubika, G., *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 1985.
- Kox, L.F.F., Noordhoek, G.T., Kunakorn, M., Mulder, S., Sterrenburg, M., Kolk, A.H.J., 1996. Microwell Hybridization Assay for Detection of PCR Products from *Mycobacterium tuberculosis* Complex and the Recombinant *Mycobacterium smegmatis* Strain 1008 Used as an Internal Control, *J Clin Microb*, vol. 34, pp. 2117-2120.
- Lim, T.K., Cherian, J., Poh, K.L., Leong, T.Y. 2000. The rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis: a cost-effectiveness analysis. *Respirology*, Vol. 5(4), pp. 403-409.
- Ling, D.I., Flores, L.L., Riley, L.W., Pai, M., 2008. Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression, *PLoS ONE* 3(2): e1536. doi:10.1371/journal.pone.0001536
- Nunc, 1999. NucleoLink Procedure for PCR-ELISA, Tech Note, Vol. 5 No. 37.
- Nunc, 1999. Versatile PCR Assays Based on Hybridization in Microwell Plates, Tech Note, Vol 5, No. 33.
- Nunc, 2005. Immobilizer Amino Instruction Protocol, No. 77102 ver 1.1 – YNI 03.05
- Pai, M., Flores, L.L., Hubbard, A., Riley, L.W., Colford, J.M. Jr., 2004. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic

- review and meta-analysis, *BMC Infect Dis* Vol. 4, pp. 6.
- Pai, M., Flores, L.L., Pai, N., Hubbard, A., Riley, L.W., et al., 2003. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Infect Dis*, Vol. 3, pp. 633–643.
- Piersimoni, C., Scarparo, C., 2003. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples, *J Clin Microbiol* Vol. 41, pp. 5355–5365.
- Rossetti, M.L.R., Jardim, S.B., Rodrigues, V.F.S., Moura, A.R., Oliveira, H., Zaha, A., 1997. Improvement of *Mycobacterium* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix, *J Microb Methods*, Vol. 28, pp. 139-146.
- Sperhackle, R.D., Mello, F.C.Q., Zaha, A., Kritski, A.L., Rossetti, M.L.R., 2004. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay, *J Tuberc Lung Dis*, Vol. 8, pp. 312-317.
- van Cleeff M., Kivihya-Ndugga L., Githui W., Ng'ang'a L., Kibuga D., Odhiambo J., Klatser P., 2005. Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis*, Vol 9(8), pp. 877-883.
- Woods, G.L., 2001. Molecular techniques in mycobacterial detection, *Arch Pathol Lab Med* Vol. 125, pp. 122–126.

4. Discussão

A falta de um diagnóstico rápido e acurado para a TB tem sido uma das principais preocupações para o controle global da doença. Atualmente, o diagnóstico e tratamento da tuberculose ativa constituem as mais importantes estratégias dos programas de controle. Em nível mundial, é elevado o número de pacientes com TB ativa não detectados. No ano de 2006, 2.500 casos de baciloscopia positiva foram relatados aos sistemas de notificação governamentais ao redor do mundo, o que constitui 62% dos 4,1 milhões de casos estimados de TB (WHO, 2008).

Para o Ministério da Saúde do Brasil, o exame prioritário para os casos suspeitos de TB pulmonar é a baciloscopia de material clínico expectorado. Isto se justifica pelo baixo custo e pela fácil execução do exame. Além disso, o paciente bacilífero é a principal fonte de manutenção de transmissão da TB na comunidade, sendo a sua identificação primordial para o controle da endemia em termos de saúde pública. Os casos detectados são freqüentemente assintomáticos por meses, sendo que a maioria deles infecta um grande número de contatos enquanto permanece indetectada, perpetuando a epidemia (SCHUGLER, 2001; PERKINS & KRITSKI, 2002).

Os testes baseados na amplificação de ácidos nucléicos foram introduzidos como novos testes promissores para o diagnóstico da TB. A vantagem mais notável destes testes é a rapidez com que o resultado pode ser obtido, o que poderia ter importantes implicações no manejo do paciente e no controle da TB. Porém, o desempenho desses métodos tem demonstrado uma disparidade entre a sensibilidade e a especificidade, onde a especificidade parece ser maximizada à custa da sensibilidade (LING *et al.*, 2008).

Este trabalho descreve a padronização de um método de diagnóstico laboratorial por PCR para TB utilizando amostras de escarro induzido de pacientes com suspeita de TB pulmonar.

A preparação das amostras clínicas (extração do DNA) foi baseada na metodologia descrita por BOOM *et al.* (1990) com modificações. Estratégia similar foi seguida por diferentes autores, pois o procedimento de purificação do DNA de

M. tuberculosis com sílica antes da amplificação por PCR possibilita uma eficaz remoção dos possíveis inibidores provenientes de sangue, escarro e outros materiais biológicos que possam inibir a ação da *Taq* DNA polimerase (ROSSETTI *et al.*, 1997; BODDINGHAUS, 2001; SPERHACKE *et al.*, 2004; SCHERER *et al.*, 2007). Quanto maior a quantidade de inibidores que for retirada no processo de purificação do DNA que precede a amplificação, melhor será o aproveitamento encontrado nos resultados. A taxa de presença de inibidores em amostras para TB varia de 0,85% a 7,5% em testes comerciais e pode chegar até a 22,7% em testes *in house* (SCHERER *et al.*, 2007; LING *et al.*, 2008). O presente estudo apresentou uma taxa de presença de inibidores de 1%, o que pode ser comparado com o encontrado em testes comerciais.

O uso do elemento de inserção IS6110 presente em *M. tuberculosis* como alvo para a amplificação por PCR já foi anteriormente descrito em inúmeros estudos (EISENACH *et al.*, 1990; THIERRY *et al.*, 1990; EISENACH *et al.*, 1991; FOLGUEIRA *et al.*, 1993; ROSSETTI *et al.*, 1997; SPERHACKE *et al.*, 2004; SCHERER *et al.*, 2007). Embora alguns estudos relatem a ausência desse elemento em algumas linhagens de *M. tuberculosis*, essas linhagens parecem estar restritas a algumas áreas geográficas da região Sul da Ásia (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1993, PARK *et al.*, 2000, NARAYANAN *et al.*, 2002). Os resultados de um estudo realizado utilizando *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) de linhagens de *M. tuberculosis* isoladas de diferentes regiões do Brasil demonstraram a presença de no mínimo uma cópia do IS6110 e uma média 10 cópias por isolado, sugerindo que as linhagens brasileiras apresentam, caracteristicamente, várias cópias do IS6110, o que permite a utilização dessa região de DNA como alvo para a amplificação (SUFFYS *et al.*, 2000; VALIM *et al.*, 2006).

Os resultados da técnica de PCR podem ser influenciados por fatores como a contaminação com produtos de DNA previamente obtidos ou perda de eficiência, tanto no processo de extração como na ação da enzima responsável pela amplificação do DNA. Para evitar resultados inadequados, esse estudo foi realizado com os cuidados necessário, principalmente com relação aos processos de extração e amplificação do DNA. Para verificar as possíveis contaminações

que poderiam ter ocorrido durante estes procedimentos, foram incluídos controles negativos de extração e amplificação, os quais foram processados com as amostras clínicas. E para verificar a eficiência dos procedimentos, foram incluídos controles positivos de extração e de amplificação, ambos com uma concentração de *M. tuberculosis* ou DNA da bactéria no limite de detecção da técnica (40-60 UFC e 10 fg, respectivamente), que também foram processados juntamente com as amostras. Em um estudo prévio, realizado por SPERHACKE *et al.* (2004), foram encontrados os mesmos limites de detecção para um teste similar.

O procedimento escolhido para a detecção do produto amplificado também influencia o resultado dos testes. Os métodos de detecção mais relatados envolvem a eletroforese em gel de agarose, utilizando brometo de etídio, ou visualização dos produtos amplificados através de sondas radioativas. Os principais inconvenientes destas metodologias são a instabilidade e os danos associados à utilização de material radioativo ou mutagênico. Mais recentemente têm sido descritos métodos em que o DNA amplificado é detectado em fase sólida através de sistemas não radioativos, tais como cor, fluorescência ou quimioluminescência (SUZUKI *et al.*, 1992; SPERHACKE *et al.*, 2004; SCHERER *et al.*, 2007). A metodologia desenvolvida e padronizada neste estudo foi a detecção colorimétrica semi-quantitativa em fase líquida. Este tipo de metodologia permite que a leitura dos resultados seja feita em espectrofotômetro, não dependendo da interpretação visual do técnico de laboratório, o que minimiza a possibilidade de erro de interpretação de resultados. A semelhança desta fase da metodologia com a técnica de ELISA, comumente utilizada em laboratórios de análises clínicas, é um fator que facilita a aplicação desta técnica em laboratórios de rotina, pois além de não exigir equipamentos específicos, também não necessita de pessoal especializado para sua execução.

Os resultados para sensibilidade (88%) e especificidade (98%) encontrados no presente estudo estão dentro do encontrado em outros estudos para testes *in house*, como, por exemplo, os resultados encontrados por SPERHACKE *et al.* (2004) e SCHERER *et al.* (2007), que encontraram respectivamente 95% e 65% para sensibilidade e 97% e 93% para especificidade. Cabe salientar que os estudos citados acima foram realizados pelo mesmo grupo do presente estudo.

Em um estudo realizado por MBULO *et al.* (2004) na Zâmbia, também uma área de elevada incidência de TB, foi encontrado 45,3% de sensibilidade e especificidade de 94,7%. Em outro estudo, realizado por LAIFER *et al.* (2004) com refugiados de guerra de Kosovo, a sensibilidade encontrada foi de 64% e a especificidade de 96,2%. Os Valores Preditivos Positivo e Negativo (VPP e VPN) encontrados neste trabalho foram de 92% e 97% respectivamente. Estes valores encontram-se ligeiramente acima do descrito em outros estudos recentes, como SCHERER *et al.* (2007), que encontrou VPP 75% e VPN 88%.

Estudos recentes de meta análise relatam que a sensibilidade e especificidade de testes moleculares, tanto comerciais como *in house*, para TB têm variado consideravelmente, com a sensibilidade se mostrando geralmente menor que a especificidade. Para testes *in house*, SARMIENTO *et al.* (2003) encontraram uma variação de 9% a 100% da sensibilidade e de 25% a 100% da especificidade. Dados que concordam com FLORES *et al.* (2005), que encontraram uma variação da sensibilidade entre 9,4% e 100%, e da especificidade entre 5,6% a 100%. Já um estudo de meta análise realizado por PAI *et al.* (2004b), no qual foram incluídos 40 estudos, sendo 26 com testes *in house* e 14 com testes comerciais, a sensibilidade dos testes *in house* se mostrou superior a dos comerciais, com média de 71% e 62% respectivamente.

Em um estudo de meta análise realizado com testes comerciais, LING *et al.* (2008) encontraram sensibilidade com média de 85%, variando de 35% a 100% e especificidade de 97%, variando de 54% a 100%. Em uma revisão, PIESIMIONI *et al.* (2003) encontraram sensibilidade variando entre 83 e 96,7% e especificidade entre 91,3 e 100%. Esses dados demonstram que especialmente a sensibilidade do teste desenvolvido no presente estudo mostrou-se mais elevada em relação a outros, e a especificidade ligeiramente superior, o que aponta para um teste de maior consistência.

Essas variações encontradas entre os estudos citados podem ser explicadas pelo uso de amostras diferentes do escarro, pela baixa concentração de bacilos em algumas amostras, como nos casos de baciloscopia negativa, presença de inibidores, diferença da prevalência da TB em cada região e a experiência do laboratório e dos técnicos em manipulação em biologia molecular.

Os melhores resultados de acurácia geralmente estão relacionados com a análise de mais de um tipo de amostra respiratória do mesmo paciente (PAI *et al.*, 2003; PAI *et al.*, 2004b; FLORES *et al.*, 2005; GRECO *et al.*, 2008; LING *et al.*, 2008).

O resultado da acurácia de um teste também é influenciado pelo padrão ouro escolhido para a avaliação dos resultados. Uma vez que a cultura, método normalmente escolhido como padrão ouro, não possui sensibilidade de 100%, a comparação de resultados com esse padrão pode indicar resultados falso-positivos. A falta de um padrão-ouro adequado para o diagnóstico da TB continua a ser um dos maiores obstáculos para a avaliação de novos métodos de diagnóstico, especialmente nos casos paucibacilares, como pacientes infectados com HIV, TB extrapulmonar e infantil. A verdadeira acurácia dos testes de biologia molecular pode, na verdade, ser melhor do que a normalmente encontrada na literatura, por causa do uso de um padrão ouro que não é ideal (GRECO *et al.*, 2008; LING *et al.*, 2008).

Dentre os resultados discrepantes encontrados no presente estudo, oito amostras apresentaram resultado falso negativo em relação ao padrão ouro escolhido (baciloscopia associada à cultura). Pode-se considerar a possibilidade da quantidade de bacilos presentes na amostra estar abaixo do limite de detecção do teste, pois, das oito amostras discrepantes, seis apresentaram poucas colônias na cultura e uma apresentou crescimento de apenas 3 colônias. Outro fator possível para explicar os resultados apresentados é a possibilidade da ocorrência de contaminação cruzada na cultura, que pode ser proveniente dos utensílios utilizados, de erro técnico ou contaminação proveniente de amostras positivas. Em uma revisão de BURMAN & REVES (2000), culturas com resultados falso-positivos foram identificadas em 13 de 14 estudos que avaliaram no mínimo 100 pacientes, neste estudo, a média de falso-positivos na cultura foi de 3,1%.

Outra discrepância foi encontrada em cinco amostras que apresentaram resultado falso positivo em relação ao padrão ouro. Nesse caso, podemos considerar que o teste pode ter apresentado uma sensibilidade superior à apresentada pelo padrão ouro escolhido, uma vez que, conforme citado anteriormente, a cultura não apresenta sensibilidade de 100%, detectando de 10 a

1000 bacilos viáveis por mL de amostra e a baciloscopia apresenta sensibilidade entre 50% e 80% (WAARD & ROBLEDO, 2007).

Também é difícil definir a importância clínica dos testes moleculares, uma vez que poucos estudos mostram qual, efetivamente, é o impacto do resultado destes testes no manejo do paciente e sobre o quanto esses resultados contribuem além do que já é obtido através dos testes convencionais (CATANZARO, 2000; LIM, 2000; LAIFER, 2004).

Em casos em que a baciloscopia é negativa, se o teste molecular também for, não há possibilidade de excluir a hipótese da doença, uma vez que esse teste não possui sensibilidade suficiente. Uma avaliação mais acurada do paciente será necessária. Por outro lado, a sensibilidade e especificidade são suficientemente confiáveis para classificar em poucas horas um paciente como TB positivo com forte suspeita clínica que teve uma baciloscopia negativa, que só iria gerar resultados positivos na cultura dentro de 2 a 8 semanas (SCHERER *et al.*, 2007). Os testes moleculares não devem substituir a cultura e a baciloscopia, mas devem ser utilizados e seus resultados interpretados junto com os testes convencionais e com os dados clínicos para o diagnóstico seguro da TB (GRECO *et al.*, 2008; LING *et al.*, 2008).

A partir do exposto acima, pode-se concluir que o teste de detecção de DNA de *M. tuberculosis* em microplacas, desenvolvido no presente estudo, mostrou sensibilidade e especificidade dentro da taxa de variação dos demais testes *in house* relatados na literatura, apresentando resultados acima da média geral encontrada nos mesmos. Esse fato demonstra o potencial do uso do teste como uma ferramenta adicional para o diagnóstico da TB, porém, estudos a respeito da sua aplicação clínica e de custo-efetividade da sua execução em laboratórios de rotina ainda devem ser realizados.

5. Referências Bibliográficas

AL ZHRANI, K.; AL JAHDALI H.; POIRIER L. L.; RENÉ P.; GENNARO M. L.; MENZIES D. Accuracy and utility of commercially available amplification and serologic test for the diagnosis of minimal pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162: 1323-9, 2000.

ALCALÁ, L.; RUIZ-SERRANO, M. J.; HERNANGÓMEZ, S.; MARÍN, M.; GARCÍA DE VIEDMA, D.; SAN JUAN, R.; BOUZA, E. Evaluation of the upgraded amplified Mycobacterium tuberculosis direct test (gen-probe) for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 41(1-2):51-56, 2001.

ALDOUS, W. K.; POUNDER, J. I.; CLOUD, J. .L; WOODS, G. L. Comparison of six methods of extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5):2471-3, 2005.

ANDERSEN, A. B.; HANSEN, E. B. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000 - molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 57:2481-2488, 1989.

ANDERSEN, A. B.; THYBO, S.; GODFREY-FAUSSETT, P.; STOKER, N. G. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, 12: 922-927, 1993.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/rconsulta_produto_internet.asp acessado em 24/08/2008.

ATS (American Thoracic Society). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. The official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention (CDC) and

the Council of the Infectious Disease Society of America. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161: 1376-1395, 2000.

BARNES, P. F.; BARROWS, S. A. Tuberculosis in the 1990's. *Annals of International Medicine*, 119: 400-410, 1993.

BARRERA, L. Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. From basic science to patient care. J. C. Palomino; S. C. Leão e V. Ritacco. www.tuberculosistextbook.com, 2007.

BARRERA, L.; KANTOR, I.; RITACCO, V.; RENERO, A.; LÓPEZ B.; BENETUCCI J.; BELTRAN, M.; LIBONATTI, O.; PADULA, E.; CASTAGNINO, J.; GONZALEZ-MONTAGNER, L. Humoral response to *Mycobacterium tuberculosis* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Tubercle and Lung Disease*, 73: 187-91, 1992.

BARRETT, A.; MAGEE, J. G.; FREEMAN, R. An evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples. *Journal of Medical Microbiology*, 51(10):895-98, 2002.

BATES, J. H. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, 1:167-174, 1980.

BATES, J. H.; STEAD, W. W. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Medicine Clinics of North America*, 77(6):1205-1217, 1993.

BATISTA, R. S; GOMES, A. P.; IGREJA, R. P.; HUGGINS, D. W. Medicina TROPICAL. Abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Ed. Cultura Médica, Capítulo 62(1): 593-610, 2001.

BEHR, M. A.; WARREN S. A.; SALAMON, H.; HOPEWELL, P. C.; PONCE DE LEON, A.; DALEY, C. L.; SMALL, P. M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 353(9151): 444-449, 1999.

BENNEDSEN, J.; THOMSEN, V. O.; PFYFFER, G. E.; FUNKE, G.; FELDMANN, K.; BENEKE, A.; JENKINS, A.; HEGGINBOTHOM, M.; FAHR, A.; HENGSTLER, M.; CLEATOR, G.; KLAPPER, P.; WILKINS, G. L. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1407-1411, 1996.

BERGMANN, J. S.; KEATING, W. E.; WOODS, G. L. Clinical evaluation of the BDProbeTec ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2):863-5, 2000

BERGMANN, J. S.; WOODS, G. L. Clinical evaluation of the BDProbeTec strand displacement amplification assay for rapid diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9):2766-8, 1998

BERLIE, H. C.; DAVID H. L.; CRUAUD, P.; PAPA, F.; PETIT, J. C. Serodiagnosis of tuberculosis in HIV infected patients using ELISA and glycolipid antigens from *Mycobacterium tuberculosis* [abstract]. In: International Conference on AIDS; Abstract MB 2181, 1991.

BLOOM, B. R. AND MURRAY C. J. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*, 257(5073): 1055-64, 1992.

BLOOM, B. R. Tuberculosis - Pathogenesis, Protection and Control. ASM, 1994.

BODDINGHAUS, B.; WICHELHAUS, T. A.; BRADE, V.; BITTNER, T. Removal of PCR Inhibitors by Silica membranes: Evaluating the Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Kit. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3750-3752, 2001.

BOGARD, M.; VINCELETTE, J.; ANTINOZZI, R.; ALONSO, R.; FENNER, T.; SCHIRM, J.; AUBERT, D.; GAUDREAU, C.; SALA, E.; RUIZ-SERRANO, M. J.; PETERSEN, H.; OOSTENDORP, L. A.; BURKARDT, H. Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in routine clinical practice. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, 20(10):724-31, 2001

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; VAN DILLEN, P. M. E. W.; VAN DER NOORDA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 495-503, 1990.

BRASIL, M. D. S. D. DATASUS - Indicadores e Dados Básicos do Brasil – 2005 - IDB2005. Plano de Controle da Tuberculose no Brasil no período de 2001-2005, 2005.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=28056 acessado em 14/06/2008A.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. Brasília, DF, 2008B.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. Manual de Normas para o Controle da Tuberculose. 4ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual técnico para o controle da Tuberculose: Cadernos de atenção básica-6. ed. Rev. Ampl. Brasília, 2002.

BRISSEON-NOEL, A.; AZNAR, C.; CHUREAU, C.; NGUYEN, S.; PIERRE, C.; BARTOLI, M.; BONETE R.; PIALOUX, G.; GICQUEL, B.; GARRIGUE, G. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet*., 338(8763):364-6, 1991.

BRISSEON-NOEL, A.; GICQUEL, B. LECOSSIER, D.; LEVYFREBAULT, V. NASSIF, X.; HANCE, A. J. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* ii: 1069-1071, 1989.

BROOKS , G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBREG, E. A. *Medical Microbiology*, 20 ed., 1995.

BURMAN, W. J.; REVES, R. R. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clinical Infectious Disease*, 31(6):1390-5, 2000.

CAMPOS, H. S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência?. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 7:51-64, 1999.

CAMUS, J. C.; PRYOR, M. J.; MÉDIGUE, C.; COLE, S. T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*, 148:2967-2973, 2002.

CATANZARO, A.; PERRY, S.; CLARRIDGE, J. E.; DUNBAR, S.; GOODNIGHT-WHITE, S.; LOBUE, P. A.; PETER, C.; PFYFFER, G. E.; SIERRA, M. F.; WEBER, R.; WOODS, G.; MATHEWS, G.; JONAS, V.; SMITH, K.; DELLA-LATTA, P. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial. *Journal of the American Medical Association*, 2;283(5):639-45, 2000.

CHAKRAVORTY, S.; DUDEJA, M.; HANIF, M.; TYAGI, J. S. Utility of universal sample processing methodology, combining smear microscopy, culture, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6):2703-8, 2005.

CHAN, J. and KAUFMANN, S. H. Immune mechanisms of protection (chapter 24). In: Bloom, B. R. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington: ASM Press, 1994.

CHEDORE, P.; JAMIESON, F.B. Rapid molecular diagnosis of tuberculous meningitis using the Gen-probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis direct test in a large Canadian public health laboratory. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 6(10):913-9, 2002.

CHEDORE, P.; JAMIESON, F.B. Routine use of the Gen-Probe MTD2 amplification test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens

in a large public health mycobacteriology laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 35(3):185-91, 1999.

CHO, S. N.; VAN DER VLIET, G. M. E.; PARK, S.; BAIK, S. H.; KIM, S. K.; CHONG, Y.; KOLK, A. H. J.; KLATSER, P. R.; KIM, J. D. Colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of amplified *Mycobacterium tuberculosis* DNA from sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 752-754, 1995.

COLE, S. T. AND BARRELL, B. G. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Novartis Found Symp 217: 160-72; discussion 172-7, 1998.

COLE, S. T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*, 148: 2919-2928, 2002.

CONDOS, R.; MCCLUNE, A.; ROM, W. N.; SCHLUGER, N. W. Peripheral-blood-based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. *Lancet*, 347: 1082-1085, 1996.

COUSINS, D. V.; WILTON, S. D.; FRANCIS, B. R.; GOW, B. L. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1):255-8, 1992.

DALCOLMO, M. P. A.; FORTES, F. F.; MELO, R.; MOTTA, J. I.; NETTO, N.; CARDOSO, M.; ANDRADE, A. W.; BARRETO, E. G.; GERHARDT. Estudo da efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 25:70-77, 1999.

DANIEL, T. M. AND B. W. JANICKI. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiological Reviews*, 42:84-113, 1978.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100: 1862-70, 2006.

DANIEL, T. M. The immunology of tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, 1:189-201, 1980.

DANNENBERG, A. M. AND ROOK, G. A. W. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses – dual mechanisms that control bacillary multiplication, Chapter 27 In: BLOOM, B. R. (Ed.). Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: ASM, 1994.

DE GRACIA, J.; CURULL, V.; VIDAL, R.; RIBA, A.; ORRIOLS, R.; MARTIN, N.; MORELL, F. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in suspected pulmonary tuberculosis. *Chest*, 93(2):329-32, 1988.

DEL VECHIO, M. A.; SMITH, K. P.; LOELFEHOLZ, M.; SPADORO, J. Amplicor mycobacteria polymerase chain reaction assays: clinical performance and future applications. Frontiers. In *Mycobacterium tuberculosis – Multi-drug resistant tuberculosis: Where do we Stand? Where are we headed?* Colorado, 23 (abstract 10), 1994.

DONOGHUE, H. D.; SPIGELMAN, M.; GREENBLATT, C. L.; LEV-MAOR, G.; BAR-GAL, G. K.; MATHESON, C.; VERNON, K.; NERLICH, A. G.; ZINK, A. R. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infectious Disease*, 4(9):584-92, 2004.

DORRONSORO, I.; MARTÍN, C.; CABODEVILLA, B.; OJER, M.; RUZ, A. Effect of the number of samples studied on the diagnosis of tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 18(5):215-8, 2000.

DROBNIEWSKI, F. A.; CAWS, M.; GIBSON, A.; YOUNG, D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infectious Disease*, 3: 141-147, 2003.

DYE, C & FLOYD, K. Chapter 16: Tuberculosis. Disease Control Priorities in Developing Countries. Jamison, D. T.; Mosley, H. W.; Measham, A. R. 2^o Edition. Washington D.C., 2006.

DYE, C.; WATT C. J.; BLEED, D. M.; WILLIAMS, B. G. What is the limit to case detection under the DOTS strategy for tuberculosis control? *Tuberculosis*, 83(1-3):35-43, 2003.

EDWARDS, P.; EDWARDS, L. Story of the tuberculin test from an epidemiologic viewpoint. *American Review of Respiratory Disease*, 81 (suppl.): 1-47, 1960.

EING, B. R.; BECKER, A.; SOHNS, A.; RINGELMANN, R. Comparison of Roche Cobas Amplicor Mycobacterium tuberculosis assay with in-house PCR and culture for detection of M. tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7):2023-9, 1998.

EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Inf. Dis.* 161: 977-981, 1990.

EISENACH, K. D.; SIFFORD, M. K.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD J. T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *American review of Respiratory Disease*, 144: 1160-1163, 1991.

ESCUADERO BUENO, C.; GARCÍA CLEMENTE, M.; CUESTA CASTRO, B.; MOLINOS MARTÍN, L.; RODRÍGUEZ RAMOS, S.; GONZÁLEZ PANIZO, A.; MARTÍNEZ GLEZ-RÍO, J. Cytologic and bacteriologic analysis of fluid and pleural biopsy specimens with Cope's needle. Study of 414 patients. *Archives of Internal Medicine*, 50(6):1190-4, 1990.

FINCH, D.; BEATY, C. D. The utility of a single sputum specimen in the diagnosis of tuberculosis. Comparison between HIV-infected and non-HIV-infected patients. *Chest*, 111(5):1174-9, 1997.

FLORES, L. L.; PAI, M.; COLFORD, J. M. JR.; RILEY, L. W. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiology*, 3;5:55, 2005.

FOLGUEIRA, L.; DELGADO, R.; PALENQUE, E.; NORIEGA, A. R. Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(4):1019-21, 1993.

GILLESPIE, S. H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2): 267-274, 2002.

GOMEZ-PASTRANA, D.; TORRONTERAS, R.; CARO, P.; ANGUITA, M. L.; LÓPEZ-BARRIO, A. M.; ANDRES, A.; NAVARRO, J. Comparison of amplicor, in-house polymerase chain reaction, and conventional culture for the diagnosis of tuberculosis in children. *Clinical Infectious Disease*, 32(1):17-22, 2001

GOODFELLOW, M. and MAGGE, J. G. Taxonomy of mycobacteria. In Gangadharam P. R. J., Jenkins, P.A. (ed). *Mycobacteria – Basic Aspects*. Chapman & Hall. New York, 1998.

GRECO, S.; GIRARDI, E.; NAVARRA, A.; SALTINI, C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis, *Thorax* Vol. 61, pp. 783–790, 2008.

GUPTA, R.; ESPINAL, M. A.; RAVIGLIONE, M. C. Tuberculosis as a major global health problem in the 21st century: a WHO perspective. *Seminars in Respiratory and Critical Care in Medicine*, 25(3):245-53, 2004.

HANNA, B. A.; EBRAHINZADEH, A.; ELLIOT, L. B.; MORGAN, M. A.; NOVAK, S. M.; RUSCH-GERDES, S.; ACIO, M.; DUMBAR, D. F.; HOLMER, T. M.; REXER, C. H.; SAVTHYAKUMAR, C.; VANNIER, A. M. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:348-752, 1999.

HARBOE, M. Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studied by crossed immunoelectrophoresis. *American Review of Respiratory Disease*, 124:80-87, 1981.

HARRIES, D.; MPHASA, N. B.; MUNDY, C.; BANERJEE, A.; KWANJANA, J. H.; SALANIPONI, F. M. Screening tuberculosis suspects using two sputum smears. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4 (1): 36-40, 2000.

HARRINGTON III, J. J.; HO, J. L.; LAPA E SILVA, J. R.; CONDE, M. B.; KRITSKI, A. L.; FONSECA, L.; SAAD, M. H. *Mycobacterium tuberculosis* lipid antigens; use of multi-antigen based enzyme immunoassay for free and complex associated antibodies. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4(2):161-167, 2000.

HERNÁNDEZ-PANDO, R.; CHACÓN-SALINAS, R.; SERAFÍN-LÓPEZ, J.; ESTRADA, I. Chapter 5 Immunology, Pathogenesis, Virulence. From basic science to patient care. J. C. Palomino; S. C. Leão e V. Ritacco. www.tuberculosistextbook.com, 2007.

HERRERA, E. A. AND SEGOVIA M. Evaluation of *mpt40* genomic fragment amplification for specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 34:1108-1113, 1996.

HOBBY, G. L.; HOLMAN, A. P.; ISEMAN, M. D.; JONES, J. M. iinumeration of tubercle bacili in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4:94-104, 1973.

HOLDEN, M.; DUBIN, M. R.; DIAMONT, P. H. Frequency of negative intermediate-strength tuberculin sensitivity in patients with active tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 285:1506-1509, 1971.

HONORÉ-BOUAKLINE, S.; VINCENSINI, J. P.; GIACUZZO, V.; LAGRANGE, P. H.; HERRMANN, J. L. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6):2323-9, 2003.

HOPEWELL, P.C. IN BLOOM, B.R. Tuberculosis: patogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, DC. 25-46, 1994.

IUATLD. INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE. Management of Tuberculosis. A guide for Low income countries. 5^aed. Paris, France: 2000.

JOHANSEN, I. S.; THOMSEN, V. Ø.; JOHANSEN, A.; ANDERSEN, P.; LUNDGREN, B. Evaluation of a new commercial assay for diagnosis of pulmonary and nonpulmonary tuberculosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, 21(6):455-60, 2002.

JONES, B.; YOUNG, S.; ANTONISKIS, D.; DAVIDSON, P.; KRAMER, F.; BARNES, P. Relationship of the manifestation of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *American Review of Respiratory Disease*, 148:1292-1297, 1993.

KIBIKI, G. S.; MULDER, B.; VAN DER VEN, A. J.; SAM, N.; BOEREE, M. J.; VAN DER ZANDEN, A.; DOLMANS, W. M. Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M. tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid. *Tropical Medicine & Internal Health*, 12(10):1210-7, 2007.

KOCAGÖZ, T.; YILMAZ, E.; ÖZKARA, S.; KOCAGÖZ, S.; HAYRAN, M.; SACHEDEVA, M.; CHAMBERS, H. F. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1435-1438, 1993.

KONOMI, N.; LEBWOHL, E.; MOWBRAY, K.; TATTERSALL, I.; ZHANG, D. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12):4738-40, 2002.

KOX, L. F.; NOORDHOEK, G. T.; KUNAKORN, M.; MULDER, S.; STERRENBURG, M.; KOLK, A. H. Microwell hybridization assay for detection of PCR products from *Mycobacterium tuberculosis* complex and the recombinant *Mycobacterium smegmatis* strain 1008 used as an internal control. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9):2117-20, 1996.

KOX, L. F.; RHIENTHONG, D.; MIRANDA, A. M.; UDOMSANTISUK, N.; ELLIS, K.; VAN LEEUWEN, J.; VAN HEUSDEN, S.; KUIJPER, S.; KOLK, A. H. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 672-678, 1994.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTÍN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2607-2618, 1999

KRITSKI, A. L. AND RUFFINO-NETO, A. Health sector reform in Brazil: impact on tuberculosis control. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4:622-26, 2000.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B., & JAMAL, L. Tuberculose e infecção pelo HIV: aspectos atuais sobre diagnóstico, tratamento e prevenção. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 6(2): 53-61, 1998.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; MUZY DE SOUZA, G.R. Tuberculose. Do Ambulatorio a Enfermaria. 2ª edição. São Paulo. Atheneu, 2000.

KUBICA, G. P.; KENT, P. T. The sputum digestion process in the mycobacteriology laboratory: contributions of centrifugal-efficiency and digestant toxicity. CDC, Proceedings on Laboratory of Mycobacteriology, 1985.

LAIFER, G.; WIDMER, A. F.; FREI, R.; ZIMMERLI, W.; FLUCKIGER, U. Polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*: impact on clinical management of refugees with pulmonary infiltrates. *Chest*, 125(3):981-6, 2004.

LEÃO, S. C. & PORTAELS, F. Chapter 1: History. In: Tuberculosis. From basic science to patient care. J. C. Palomino; S. C. Leão e V. Ritacco. www.tuberculosistextbook.com, 2007.

LIM, T. K.; GOUGH, A.; CHIN, N. K.; KUMARASINGHE, G. Relationship between estimated pretest probability and accuracy of automated *Mycobacterium tuberculosis* assay in smear-negative pulmonary tuberculosis. *Chest*, 118(3):641-7, 2000.

LING, D. I.; FLORES, L. L.; RILEY, L. W.; PAI, M. Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression, *PLoS ONE* 3(2): e1536, 2008.

LIU, K. T.; SU, W. J.; PERNG, R. P. Clinical utility of polymerase chain reaction for diagnosis of smear-negative pleural tuberculosis. *Journal of Chinese Medical Association*, 70(4):148-51, 2007.

MANJUNATH, N.; SHANKAR, P. RAJAN, L., BHARGAVA, A.; SALULA, S.; SHIRINIWAS. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle*, 72: 21-27, 1991.

MARTIN-CASABONA, N.; FUENTE, T. G.; APA, F.; URGELL, J. R.; LA, R. V.; GRAU, G. C.; CAMPS, I. R. Time course of anti-SL-IV immunoglobulin G antibodies in patients with tuberculosis and tuberculosis-associated AIDS. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 1089-93, 1992.

MAUGEIN, J.; FOURCHE, J.; VACHER, S.; GRIMOND, C.; BEBEAR, C. Evaluation of the BDProbeTec ET DTB assay(1) for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44(2):151-5, 2002.

MAZUREK, G. H.; JEREB, J.; LOBUE, P.; IADEMARCO, M. F.; METCHOCK, B.; VERNON, A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. *MMWR Recommendations and Reports*, 54:49-55, 2005.

MAZZARELLI, G.; RINDI, L.; PICCOLI, P.; SCARPARO, C.; GARZELLI, C.; TORTOLI, E. Evaluation of the BDProbeTec ET system for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary and extrapulmonary samples: a multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4):1779-82, 2003.

MBULO, G. M.; KAMBASHI, B. S.; KINKESE, J.; TEMBWE, R.; SHUMBA, B.; GODFREY-FAUSSETT, P.; MCNERNEY, R. Comparison of two bacteriophage tests and nucleic acid amplification for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in

sub-Saharan Africa. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 8(11):1342-7, 2004.

MEJIA, G. I.; CASTRILLON, L.; TRUJILLO, H.; ROBLEDO, J. A. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3(2):138-42, 1999.

MELLO, F. C.; BASTOS, L. G.; SOARES, S. L.; REZENDE, V. M.; CONDE, M. B.; CHAISSON, R. E.; KRITSKI, A. L.; RUFFINO-NETTO, A.; WERNECK, G. L. Predicting smear negative pulmonary tuberculosis with classification trees and logistic regression: a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 23;6:43, 2006.

MENZIES, D.; PAI, M.; COMSTOCK, G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Annals of Internal Medicine*, 146:340-354, 2007.

MITARAI, S.; SHISHIDO, H.; KURASHIMA, A.; TAMURA, A.; NAGAI, H. Comparative study of amplicor *Mycobacterium* PCR and conventional methods for the diagnosis of pleuritis caused by mycobacterial infection. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4(9):871-6, 2000.

MITCHISON, D. A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle*, 66: 219-226, 1985.

MOSTRÖM, P.; GORDON, M.; SOLA, C.; RIDELL, M. and RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 8: 694-704, 2002.

MURRAY, P. Manual of Clinical Microbiology 7 th Edition, 1999/ Metchock, B. G., Nolte, F. S., and Wallace, R. J. Jr., 1999.

NARAYANAN, S.; DAS, S.; GARG, R.; HARI L, RAO V. B.; FRIEDEN, T. R.; NARAYANAN, P. R. Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in south India: Implications for disease control and prevention. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:4785-4788, 2002.

NELSON, S. M.; DEIKE, M. A.; CARTWRIGHT, C. P. Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2):467-9, 1998.

NOLTE, F. S.; METCHOCK, B.; MCGOWAN JR., J. E.; EDWARDS, A.; OKWUMABUA, O.; THURMOND, C.; MITCHELL, P. S.; PLIKAYTIS, B.; SHINNICK, T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1777-1782, 1993.

NOORDHOEK, G. T.; EMBDEN, J. D. A.; KOLK, A. H. J. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 34:2522-2525, 1996.

NOORDHOEK, G. T.; KOLK, A. H.; BJUNE, G.; CATTY, D.; DALE, J. W.; FINE, P. E.; GODFREY-FAUSSETT, P.; CHO, S. N.; SHINNICK, T.; SVENSON, S. B.; WILSON, S.; VAN EMBDEN, J. D.A. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:277-284, 1994.

NOORDHOEK, G. T.; MULDER, S.; WALLACE, P.; VAN LOON, A. M. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(4): 295-301, 2004.

ONYEBUJOH, P. & ROOK, G. A. W. Tuberculosis. *Nature reviews / microbiologia*, Vol 2: 930-932, 2004.

O'SULLIVAN, C. E.; MILLER, D. R.; SCHNEIDER, P. S.; ROBERTS, G. D. Evaluation of Gen-Probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test by using respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5):1723-7, 2002.

PAI, M.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M. JR. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 4:761-776, 2004a.

PAI, M.; FLORES, L. L.; HUBBARD, A.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M. JR. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 23;4:6, 2004b.

PAI, M.; FLORES, L. L.; PAI, N.; HUBBARD, A.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M. JR. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, 3(10):633-43, 2003.

PALOMINO, J. C.; PORTAELS, F. Microcolony detection for a rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. . *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4(1):91, 2000.

PARK, W. G.; BISHAI, W.; CHAISON, R. E.; DORMAN, S. E. Performance of the microscopic observation drug susceptibility assay in drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12):4750-4752, 2002.

PARK, Y. K.; BAI, G. H.; KIM, S. J. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1):191-197, 2000.

PERKINS, M. & KRITSKI, A. L. Diagnosis testing in the control of tuberculosis. World Health Organization. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(6):512-513, 2002.

PETRINI, B. & HOFFNER, S. Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agent*, 13: 93-97, 1999.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12):5355-65, 2003.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C.; PICCOLI, P.; RIGON, A.; RUGGIERO, G.; NISTA, D.; BORNIGIA, S. Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11):4138-42, 2002.

QUEROL, J. M.; FARGA, M. A.; GRANDA, D.; GIMENO, C.; GARCIA-DE-LOMAS, J. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Clinical Investigations - Chest*, 107(6): 1631-1635, 1995.

RAJALAHTI, I.; VUORINEN, P.; NIEMINEN, M. M.; MIETTINEN, A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum specimens by the automated Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium Tuberculosis* Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4):975-8, 1998.

REISCHL, U.; LEHN, N.; WOLF, H.; NAUMANN, L. Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(10):2853-60, 1998.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N. & RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Revista de Saúde Pública*, 36: 525-532, 2002.

ROSSETTI, M. L. R.; JARDIM, S. B.; RODRIGUES, V. F. S.; MOURA, A. R.; OLIVEIRA, H.; ZAHA, A.; Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *Journal of Microbiological Methods*, 28:139-146, 1997.

SALO, W. L.; AUFDERHEIDE, A. C.; BUIKSTRA, J.; HOLCOMB, T. A. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 15;91(6):2091-4, 1994.

SAMB, B.; SOW P. S.; KONY, S.; MAYNART-BADIANE, M.; DIOUF, G.; CISSOKHO, S.; BA, D.; SANE, M.; KLOTZ, F.; FAYE-NIANG, M. A.; MBOUP, S.;

NDOYE, I.; DELAPORTE, E.; HANE, A. A.; SAMB, A.; COULAND, J. P.; COLL-SECK, A. M.; LAROUZE, B.; MURRAY, J. F. Risk factors for negative sputum acid-fast bacilli smears in pulmonary tuberculosis: results from Dakar, Senegal, a city with low HIV seroprevalence. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 394:33-336, 1999.

SANTOS, A. R.; MIRANDA, A. B.; LIMA, L. M.; SUFFYS, P. N.; DEGRAVE, W.M. Method for high yield preparation in large and small scale of nucleic acids from mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 15: 83-94, 1992.

SARKAR, S. K.; SHARMA, G. S.; GUPTA, P. R.; SHARMA, R, K. Fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tubercle*, 61(2):97-9, 1980.

SARMIENTO, O. L.; WEIGLE, K. A. K.; ALEXANDER, J.; WEBER, D. J.; MILLER, W. C. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7):3233-3240, 2003.

SCHERER, L. C.; SPERHACKE, R. D.; JARCZEWSKI, C.; CAFRUNE, P. I.; MINGHELLI, S.; RIBEIRO, M. O.; MELLO, F. C.; RUFFINO-NETTO, A.; ROSSETTI, M. L.; KRITSKI, A. L. PCR colorimetric dot-blot assay and clinical pretest probability for diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in smear-negative patients. *BMC Public Health*, 20;7:356, 2007.

SCHLUGER, N. W. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(11):2020-4, 2001.

SES. SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO RS, 2008
<http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp>

SHAH, J. S.; LIU, J.; BUXTON, D.; STONE, B.; NIETUPSKI, R.; OLIVE, D. M.; KING, W.; KLINGER, J. D. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from spiked human sputum by Q-beta replicase-amplified assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 322-328, 1995.

SHAH, S.; MILLER, A.; MASTELLONE, A.; KIM, K.; COLANINNO, P.; HOCHSTEIN, L.; D'AMATO, R. Rapid diagnosis of tuberculosis in various biopsy and body fluid specimens by the AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction test. *Chest*, 113(5):1190-4, 1998.

SHAWAR, R. M.; EL-ZAATARI, F. A.; CLARRIDGE, J. E. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two step polymerase chain reaction and non-isotopic hybridization methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:61-65, 1993.

SINGH, M. & ESPITIA, C. Chapter 13: Immunological Diagnosis. From basic science to patient care. J. C. PALOMINO; S. C. LEÃO E V. RITACCO. www.tuberculosistextbook.com, 2007.

SILVA, M. S.; SENNA, S. G.; RIBEIRO, M. O.; VALIM, A. R.; TELLES, M. A.; KRITSKI, A.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C.; ZAHA, A. & ROSSETTI, M. L. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Clinical Microbiology*, 41: 4471-4, 2003.

SJOBRING, U.; MECKLENBURG, M.; ANDERSEN, A. B.; MIORNER, H. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 2200-2204, 1990.

SMALL, P. M. & VAN EMBDEN, D. A. IN BLOOM B. R. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, DC, 1994.

SMITH, P.G. & MOSS, A.R. In Bloom, B. R. Epidemiology of tuberculosis Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press, Washington DC, 1994.

SOINI, H.; AGHA, S. A.; EL-FIKY, A.; VILJANEN, M. K. Comparison of amplicor and 32-kilodalton PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(7):1829-30, 1996.

SOMOSKOVI, A.; SONG, Q.; MESTER, J. M.; TANNER, C.; HALE, Y.; PARSONS, L.; SALFINGER, M. Use of molecular methods to identify the

Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) and other mycobacterial species and to detect rifampin with the BACTEC MGIT 960 system. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7):2822-2826, 2003.

SOTOMAYOR, H.; BURGOS, J.; ARANGO, M. Demonstration of tuberculosis by DNA ribotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a Colombian prehispanic mummy *Biomedica*, 24 Supp 1:18-26, 2004.

SPERHACKE, R. D., MELLO, F. C. Q., ZAHA, A., KRITSKI, A. L., ROSSETTI, M. L. R. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay, *Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Vol. 8, pp. 312-317, 2004.

STEAD, W. W.; DUTT, A. K. Epidemiology and host factors. In: SCHLOSSBERG, D. *Tuberculosis*, second edition, New York, 1-12, 1989.

STEINGART, K. R.; NG, V.; HENRY, M.; HOPEWELL, P. C.; RAMSAY, A.; CUNNINGHAM, J.; URBANCZIK, R.; PERKINS, M. D.; AZIZ, M. A.; PAI, M. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(10):664-74, 2006.

STYBLO, K. Epidemiology of Tuberculosis. Royal Netherlands Tuberculosis Association Selected Papers. *Royal Netherlands Tuberculosis Association*. The Hague, 1991.

STYBLO, K.; ROUILLON, A. Estimated global incidence of smear positive pulmonary tuberculosis. Unreliability of officially reported figures on tuberculosis. *Bulletin of the International Union against Tuberculosis*, 56: 118-125, 1981.

SUFFYS, P. N.; ARAÚJO, M. E. I.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A.; BARROSO, E. W.; BARRETO, A. M.; CAMPOS, E.; VAN SOOLINGEN, D.; KREMER, K.; HEERSMA, H.; DEGRAVE, W. M. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strain of *Mycobacterium tuberculosis* and

comparison with an international fingerprint database. *Research in Microbiology*, 151: 343-351, 2000.

SUZUKI, K.; OKAMOTO, N.; WATANABE, S.; KANO, T. Chemiluminiscent microliter method for detecting PCR amplified HIV-1 DNA. *Journal of Virological Methods*, 38:113-122, 1992.

TAKAHASHI, T.; NAKAYAMA, T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for Mycobacterium tuberculosis DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3):1029-39, 2006.

TAKAHASHI, T.; TAMURA, M.; ASAMI, Y.; KITAMURA, E.; SAITO, K.; SUZUKI, T.; TAKAHASHI, S. N.; MATSUMOTO, K.; SAWADA, S.; YOKOYAMA, E.; TAKASU, T. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for Mycobacterium tuberculosis DNA: development and methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5):1708-15, 2008.

THIERRY, D.; BRISSON-NOEL, A.; VINCENT-LEVY-FREBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J. L.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(12):2668-73, 1990.

TORTOLI, E. e PALOMINO, J. C. Chapter 14: New Diagnosis Methods. From basic science to patient care. J. C. PALOMINO; S. C. LEÃO E V. RITACCO. www.tuberculosistextbook.com, 2007.

TREWICK, S. A.; DEARDEN, P. A rapid protocol for DNA extraction and primer annealing for PCR sequencing. *Biotechniques*, 17(5):842-4, 1994.

TRUJILLO, W. F. C. & KRITSKI, A. L. Tuberculose. Em: Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro, 2001.

TUBERCULOSE. API TB Consensus Guidelines 2006: Management of pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situations. *Journal of Association of Physicians of Índia*, 54: 219-34, 2006.

TUBERCULOSE. II Consenso Brasileiro - Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 30(1), 2004.

VALENTINE-THON, E. Quality control in nucleic acid testing-where do we stand? *Journal of Clinical Virology*, 25: S13-S21, 2002.

VALIM, A. R.; POSSUELO, L. G.; CAFRUNE, P. I.; BORGES, M.; RIBEIRO, M. O.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Evaluation and genotyping of multidrug-resistant cases of tuberculosis in southern Brazil. *Microbiological Drug Resistance*, 12(3):186-91, 2006.

VAN EMBDEN, J. D.; VAN SOOLINGEN, D.; SMALL P. M.; HERMANS, P. W. M. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Research in Microbiology*, 143: 385-391, 1992.

VAN SOOLINGEN, D.; HASS, P. E. W., HERMANS, P. W. M.; GROENEN, P. M. A.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strains differentiations and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1987-1995, 1993.

VICTOR, T.; DU TOIT, R.; VAN HELDEN, P. D. Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 1514-1517, 1992.

WAARD, H. e ROBLEDO, J. Chapter 12: Conventional Diagnosis Methods. From basic science to patient care. J. C. PALOMINO; S. C. LEÃO E V. RITACCO. www.tuberculosis-textbook.com, 2007

WALKER, D.; MCNERMEY, R.; MWEMBO, M. K.; FOSTER, S.; TIHON, V.; GODFREY-FAUSSET, P. An incremental cost-effectiveness analysis of the first, second and third sputum examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4 (3): 246-251, 2000.

WATTERSON, S. A.; DROBNIOWSKI, F. A. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *Journal of Clinical Pathology*, 53(10):727-32, 2000.

WEIL, A.; PLIKATIS, B. B.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L.; SHINNICK, T.M. The *mpt40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis* . *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9):2309-231,1996.

WHO. Tuberculosis Facts, 2007.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. WHO Report 2008.

WILSON, S. M.; MCNERNEY, R.; NYE, P. M.; GODFREY-FAUSSTT, P. D.; STOKER, N. G.; VOLLER, A. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* , 31:776-782, 1993.

WOODS, G. L.; BERGMANN, J. S.; WILLIAMS-BOUYER, N. Clinical Evaluation of the Gen-Probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in select nonrespiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2):747-9, 2001.

YASSIN, M. A.; CUEVAS, L. E. How many sputum smears are necessary for case finding in pulmonary tuberculosis? *Tropical Medicine & International Health*, 8(10):927-32, 2003.

ZAMBARDI, G.; ROURE, C.; BOUJAAFAR, N.; FOUQUE B.; FRENEY, J.; FLEURETTE, J. Comparison of three primer sets for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*, 50: 893-897, 1993.

ZINK, M.; RATH, M.; WALTENSCHLÖGER, A.; ENGLER, J.; RUMPOLD-SEITLINGER, G.; TOLLER, W.; REINHARDT, F. Unilateral presentation of a large epidural hematoma. *Anesthesiology*, 98(4):1032-3, 2003.