

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

Ana Cláudia Carvalho Gouveia

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA
IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* EM
CULTURA DE ESCARRO NO MEIO BACTEC 12B**

**Vitória
2006**

ANA CLÁUDIA CARVALHO GOUVEIA

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA
IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* EM
CULTURA DE ESCARRO NO MEIO BACTEC 12B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências - Patologia das Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

Co-orientadora: Prof^a. Solange A. Vinhas

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CAPES –
Vitória
2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

G719a Gouveia, Ana Cláudia Carvalho, 1969-
Avaliação da reação em cadeia da polimerase para identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em cultura de escarro no meio BACTEC 12B / Ana Cláudia Carvalho Gouveia. – 2006.
94 f. : il.

Orientador: Moisés Palaci.

Co-Orientadora: Solange A. Vinhas.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Tuberculose. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Identificação. I. Palaci, Moisés. II. Vinhas, Solange A. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

**A Deus,
Pela bênção da vida
E da capacidade de pensar.**

**Aos meus pais Hélio e Catharina,
Fontes da minha vida e da minha formação ética.**

**Aos meus irmãos,
Por crescermos juntos e pelos
momentos de alegria.**

**Ao amor de minha vida,
por me fazer feliz,**

Zé Flávio.

**E às minhas maiores riquezas,
Isabela e Matheus,
para que aprendam que nem só de pão vive o homem,
mas de sonhos e esperanças.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Moisés Palaci, pela disposição para ensinar e, sobretudo, pela paciência e compreensão no decorrer desta jornada.

À Prof^a. Solange Alves Vinhas, por seu estímulo e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às biólogas Renata L. Peres e Fabíola K. C. Ribeiro, e às farmacêuticas-bioquímicas Tatiana R. Có e Elenice M. Lemos, pelo estímulo constante e pelo apoio técnico e científico.

À Marcela, minha amiga incondicional, por sua amizade, seu apoio e estímulo, fundamentais nos momentos mais difíceis.

Às amigas do Laboratório de Imunologia do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES: Eneida, Carlinha e Valéria, pelo apoio, fraterna convivência e por ter me acolhido com tanto carinho.

Ao Prof. Dr. Fausto Edmundo. Lima. Pereira, pelos inestimáveis ensinamentos transmitidos e pela determinação incansável de ensinar.

A todos os professores do curso de pós-graduação, pelo aprendizado proporcionado.

Aos amigos e colegas do mestrado, pelos momentos de convivência enriquecedores.

Aos colegas do NDI João Batista P. Silva, Hildete N. Silva, Maria Guimarães, Rafael Vieira, Gustavo Morais e Fátima A. Pereira, pela amizade e disposição em me ajudar.

Ao Prof. Dr. Reynaldo Dietze, por nos acolher no Núcleo de Doenças Infecciosas.

Aos pacientes com tuberculose que, indiretamente, participaram desta pesquisa e que vivem com coragem os dias de hoje, sonhando com as esperanças do amanhã.

Aos meus pais Catharina e Hélio, pela dedicação, esforço e determinação na nossa educação. Obrigada por todas as oportunidades e apoio que me deram. É de vocês minha vitória.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, que torceram por mim e me incentivaram na busca deste ideal.

Ao meu marido José Flávio e meus filhos Isabela e Matheus, obrigada pela paciência e compreensão durante os períodos de stress. Vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro que possibilitou a realização desta dissertação.

***Depois de escalar uma montanha muito alta,
descobrimos que há muitas outras montanhas por escalar.***

Nelson Mandela

RESUMO

A utilização de métodos laboratoriais rápidos para a detecção e identificação do *Mycobacterium tuberculosis* é crucial para a prevenção e o controle da tuberculose. Embora técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos apresentem alta sensibilidade e reduzam consideravelmente o tempo de identificação deste bacilo, há uma grande carência de estudos sobre a avaliação de *primers* específicos para detecção de *M. tuberculosis* em meios de culturas líquido (BACTEC 12B e ou MGIT) em condições de rotina diagnóstica. Diante deste fato, propusemo-nos a avaliar a reação em cadeia da polimerase utilizando um par de *primers* específico para a IS6110 (PCR IS6110), para detecção do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em culturas em meios BACTEC 12B. Um total de 107 amostras de escarro foi processado e inoculado em meio de Ogawa e BACTEC 12B. Uma alíquota dos cultivos em meio 12B que apresentaram índice de crescimento (IC) igual ou maior a 30 foi submetida à amplificação através da PCR IS6110. Os resultados do método molecular foram comparados à identificação obtida através de métodos fenotípicos. Das 107 culturas avaliadas, 90 foram identificadas através dos métodos fenotípico e molecular como *M. tuberculosis*, e todas as culturas ($n = 8$) com crescimento de outras micobactérias que não *M. tuberculosis* apresentaram resultado de PCR negativo, com exceção de uma amostra. A identificação fenotípica não foi possível em dois cultivos que apresentaram crescimento concomitante de micobactérias e microrganismos contaminantes, sendo que estas duas culturas apresentaram resultado negativo de PCR. Os resultados das demais sete culturas foram negativos por ambos os métodos. A identificação molecular do *M. tuberculosis* foi especialmente relevante em 44 culturas provenientes de escarros que apresentaram baciloscopia negativa e em três culturas de BACTEC 12B contaminadas, sendo que, em média, a identificação ocorreu 5,5 e 16 dias, respectivamente, mais rápido quando comparada à identificação fenotípica. Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram a eficácia da PCR IS6110 na identificação rápida de *M. tuberculosis* em cultivos de meios 12B (100% de sensibilidade e 87,5% de especificidade), e evidenciam a relevância da técnica no diagnóstico precoce da tuberculose pulmonar, sobretudo em pacientes paucibacilíferos.

ABSTRACT

Use of the most rapid and reliable laboratory tests for *Mycobacterium tuberculosis* detection and identification is important for tuberculosis (TB) control. Diagnostic techniques based on molecular biology methods are able to dramatically reduce the time of detection as well as increase the sensitivity for detecting the bacilli. A polymerase chain reaction DNA amplification method for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex (PCR IS6110) in BACTEC 12B broth cultures was evaluated. A total of 107 sputum samples were processed by standard methods, and then inoculated into Ogawa slants and BACTEC 12B vials. The PCR assay was used on BACTEC 12B broth cultures with a growth index (GI) of equal to or greater than 30. Molecular results were compared to those obtained by phenotypic identification methods. Of the 107 broth cultures evaluated, 90 were all culture and PCR positive for *M. tuberculosis*. Except for one, all cultures ($n = 8$) which grew mycobacteria other than *M. tuberculosis* were PCR negative. In two cultures which grew both mycobacteria and other organisms than acid-fast bacilli a phenotypic identification was not possible, and both of them were PCR negative. The remaining seven cultures that did not contain mycobacteria were PCR negative. Of particular interest were all 44 cultures positive from smear-negative sputum specimens and three contaminated BACTEC 12B broth cultures yielding mycobacterial growth which a *M. tuberculosis* Complex, which were successfully identified by PCR, resulting in a mean time to identify *M. tuberculosis* of 5,5 and 16 days before phenotypic identification, respectively. In light of an overall sensitivity and specificity of 100% and 87,5%, respectively, coupled with the ability to identify the bacilli days or weeks before other methods can be applied, we conclude that PCR might prove to be a rapid alternative for identification of *M. tuberculosis* Complex in culture, even in the context of paucibacillary patients.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	do inglês “American Type Culture Collection”
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
BCG	bacilo de Calmette-Guérin
CDC	do inglês “Centers for Disease Control and Prevention”
°C	grau Celsius
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitidina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dTTP	desoxitimidina trifosfato
DNA	ácido desoxiribonucléico
DTT	dithiotreitol
<i>et al.</i>	e colaboradores
X g	força centrífuga
h	horas
hab	habitantes
HIV	do inglês “Human Immunodeficiency Vírus” ou Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	índice de crescimento microbiano
IS6B	<i>primer</i> 5’ GGC TGT GGG TAG CAG ACC 3’

IS7B	<i>primer 5' CGG GTC CAG ATG GCT TGC 3'</i>
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
MDR-TB	do inglês "Multidrug Resistant Tuberculosis" ou tuberculose multirresistente
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
µg/mL	microgramas por microlitro
µL	microlitros
µm	micromilímetros
MS	Ministério da Saúde
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NALC-NaOH	N-acetil-L-cisteína com hidróxido de sódio
NAP	p-nitro-α-acetilamino-β-hidroxiopropiofenona
NTM	micobactéria não causadora de tuberculose
OMS	Organização Mundial da Saúde
O ₂	oxigênio
PANTA	polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina

PAS	placa de agar sangue
pb	pares de base
PBS	solução de tampão fosfato
PCR	do inglês "Polymerase Chain Reaction" ou Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	picomolar
PNB	ácido p-nitrobenzóico
RNA	ácido ribonucléico
seg	segundos
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SINAM	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Taq	bactéria termofílica <i>Thermus aquaticus</i>
TCH	ácido 2-tiofenocarboxílico
U	unidades
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
ZN	Ziehl-Neelsen
¹⁴ C	radioisótopo do carbono
¹⁴ CO ₂	dióxido de carbono radioativo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diferenciação entre o Complexo <i>M. tuberculosis</i> e micobactérias não causadoras de tuberculose (NTM)	30
Tabela 2	Resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR IS6110) em relação aos microrganismos isolados e identificados, através dos métodos fenotípicos, no meio de cultura BACTEC 12B	55
Tabela 3	Resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR IS6110) em relação ao exame microscópico e índice de crescimento (IC) no meio de cultura BACTEC 12B	56
Tabela 4	Comparação entre a média de tempo (em dias) para a identificação do <i>M. tuberculosis</i> pelos métodos molecular e fenotípico (NAP)	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativa da taxa incidência de tuberculose em 2003	20
Figura 2	Algoritmo do processamento das amostras de escarro analisadas	45
Figura 3	Seqüência de inserção IS6110, de 1,35kb, presente no genoma de membros do Complexo <i>M. tuberculosis</i>	46
Figura 4	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% dos produtos amplificados pela reação em cadeia da polimerase	52
Figura 5	Resultado da avaliação da especificidade dos <i>primers</i> na amplificação do fragmento de 123pb do IS6110.....	53
Figura 6	Resultado da reação de amplificação do DNA de <i>M. tuberculosis</i> em meios 12B.....	54

GRÁFICO

Gráfico 1	Resultados de baciloscopia dos escarros submetidos à cultura de micobactérias no sistema BACTEC 460 TB	59
------------------	--	----

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICO

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1. Situação epidemiológica da tuberculose.....	19
1.2. Patogenia e transmissão da tuberculose.....	21
1.3. O agente etiológico.....	22
1.4. Diagnóstico da tuberculose pulmonar.....	23
1.4.1. Diagnóstico clínico.....	23
1.4.2. Diagnóstico radiológico.....	24
1.4.3. Diagnóstico microbiológico.....	25
1.4.3.1. Baciloscopia.....	25
1.4.3.2. Cultura.....	26
1.4.3.3. Identificação fenotípica.....	29
1.4.4. Diagnóstico molecular.....	31
1.4.4.1. Métodos de amplificação de ácidos nucleicos a partir de espécimes clínicos	31
1.4.4.2. Métodos moleculares de identificação a partir de do cultivo de micobactérias.....	33
2. Objetivos	36
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. Material e métodos.....	38
3.1. Caracterização das amostras.....	39

3.2. Coleta das amostras	39
3.3. Exames laboratoriais	40
3.3.1. Digestão e descontaminação das amostras.....	40
3.3.2. Exame microscópico dos esfregaços de escarro (baciloscopia).....	40
3.3.3. Cultura.....	41
3.3.3.1 Cultura em meio de Ogawa.....	41
3.3.3.2 Cultura em meio BACTEC 12B (sistema semi- automatizado).....	41
3.3.3.2.1 Culturas com crescimento de microrganismos (índice de crescimento igual ou maior a 30).....	42
3.3.4. Identificação do <i>Mycobacterium. tuberculosis</i> por métodos fenotípicos.....	43
3.3.4.1 Aspéctos fenotípicos das colônias.....	43
3.3.4.2 Inibição do crescimento bacteriano em presença de ácido p- nitrobenzóico (PNB) e ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH).....	43
3.3.4.3 Inibição do crescimento bacteriano em presença de p-nitro- α -acetilamino- β - hidroxipropriofenona (NAP).....	44
3.3.4.4 Interpretação dos resultados fenotípicos.....	44
3.3.5. Identificação do Complexo <i>M. tuberculosis</i> por método molecular.....	45
3.3.5.1 Extração do DNA.	45
3.3.5.2 Reação em cadeia da polimerase.....	46
3.3.5.2.1 Primers.....	46
3.3.5.2.2 Amplificação pela técnica de PCR IS6110.....	47
3.3.5.2.3 Detecção do produto amplificado.....	47
3.3.5.3 Avaliação prévia da técnica de PCR IS6110	48
3.3.5.3.1 Avaliação da especificidade dos primers	48

3.3.5.3.2	Avaliação da capacidade da PCR IS6110 em detectar <i>M. tuberculosis</i> H37Ra em meios BACTEC 12B com diferentes índices de crescimento	49
4.	Resultados.....	50
4.1	Avaliação prévia da técnica de PCR IS6110.....	51
4.1.1	Avaliação da especificidade dos <i>primers</i>	51
4.1.2	Avaliação da capacidade da PCR IS6110 em detectar <i>M. tuberculosis</i> H37Ra em meios BACTEC 12B com diferentes índices de crescimento	53
4.2	Análise do desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR IS6110) para identificação do <i>M. tuberculosis</i> a partir de cultura de escarros em meios BACTEC 12B	54
5.	Discussão.....	60
6.	Conclusões.....	74
7.	Referências bibliográficas.....	76

I. Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Situação Epidemiológica da Tuberculose

Dentre os longos anos de existência da tuberculose (TB), o último século foi marcado por incontestáveis avanços científicos, objetivando o combate à doença. Entretanto, nas últimas décadas, o mundo tem testemunhado o aumento do número de novos casos e uma falha no controle da doença, manifestada pelo aparecimento da tuberculose multirresistente às drogas (MDR-TB). Nos países em desenvolvimento, a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* é a segunda maior causa de mortes por doença infecciosa em adultos, perdendo somente para a infecção com o vírus da imunodeficiência humana - HIV (DYE, 2006; WHO, 1998).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2004, em todo o mundo, surgiram cerca de 8,9 milhões novos casos da doença, sendo que aproximadamente 1,7 milhões de mortes foram atribuídos à tuberculose. Cerca de cem milhões de pessoas são infectadas com o bacilo a cada ano. Mais de 95% dos casos de TB ocorrem nos países subdesenvolvidos, onde, entre 30 e 60 % dos adultos estão infectados (WHO, 2006a; DYE, 1999). Destes, entre 8 e 10 milhões desenvolverão a doença durante toda a vida, sendo que cerca da metade apresentará as formas contagiantes. Em algumas partes do mundo, a tuberculose é epidêmica, principalmente devido à coinfeção pelo HIV e o aumento da multirresistência às drogas, fatores que contribuem para a disseminação da doença (DYE, 2006; CORBETT, 2003; HARRIES, 2001).

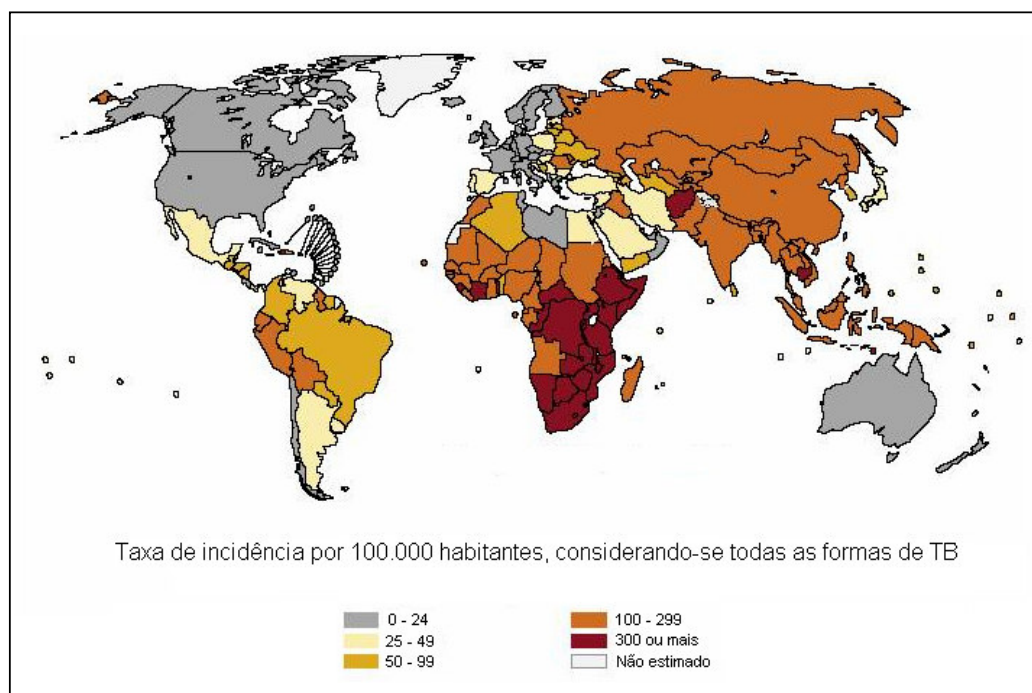


Figura 1 - Estimativa da taxa incidência de tuberculose em 2003.
Fonte: WHO, 2006

Nas Américas, entre 1994 e 2004 foram notificados, anualmente, entre 230.000 e 260.000 casos de tuberculose, com notáveis diferenças entre as regiões mais desenvolvidas e os países em desenvolvimento (WHO, 2006a). Felizmente, entre 1994 e 2003, a incidência da doença em alguns países da região mostrou uma tendência de queda em torno de 1,6% ao ano, decorrente da implantação de programas nacionais de controle à doença (DYE, 2006; WHO, 2006a).

O Brasil é o único país das Américas situado entre os 22 responsáveis por 80% dos casos de tuberculose no mundo, ocupando a 16ª posição (WHO, 2006a). O Ministério da Saúde estima uma prevalência de 58 casos / 100.000 hab, com cerca de 50 milhões infectados e 111.000 casos novos anualmente. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), por ano, são notificados 85 mil novos casos, correspondendo a uma taxa de incidência de 47,2 / 100.000 habitantes. A cada ano, a doença é responsável por cerca de 6 mil óbitos no país e a região Sudeste apresenta, atualmente, o maior número de casos notificados.

Em 1999, o Espírito Santo ocupou o 2º lugar da região sudeste em incidência de formas bacilíferas da doença (30,1 / 100.000 hab) (RUFFINO-NETO, 2001). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS), em 2003, a taxa de incidência no Espírito Santo foi de 40,4 / 100.000 hab, sendo que os casos bacilíferos corresponderam a 24,6 casos / 100.000 hab (BRASIL, 2005).

1.2 Patogenia e transmissão da tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), caracterizada por apresentar evolução crônica e comprometimento dos pulmões e ou outros sítios extrapulmonares. Geralmente, os sinais e sintomas da tuberculose pulmonar são os mesmos observados em outras doenças respiratórias (tosse, febre e suores noturnos), sendo a extensão temporal destas manifestações um dado indicativo da doença (GARAY, 2004).

Características relacionadas ao microrganismo, ao hospedeiro e às interações entre ambos influenciam as manifestações clínicas da doença (STEWART *et al.*, 2003; RUSSELL, 2001). Em função da multiplicação lenta do *M. tuberculosis*, o processo inflamatório é brando e a doença tem evolução crônica. Os sintomas tendem a ser insidiosos, de intensidade crescente, podendo apresentar períodos de remissão (BRASIL, 2002).

A doença pode se manifestar em qualquer tecido. No entanto, os pulmões representam a principal via de entrada do bacilo e o local mais comum de manifestação da doença. Menos de 10% de todos os casos da doença desenvolverá tuberculose extrapulmonar, resultante da disseminação bacilar por via linfática e/ou hematogênica, preferencialmente para locais com maior suprimento de oxigênio, como cérebro, rins, ossos e linfonodos (GARAY, 2004).

A transmissão da tuberculose ocorre através da inalação de partículas contendo o *M. tuberculosis* (**partículas-núcleo de Wells**), transmitidas através da tosse, espirro ou fala de pessoas com TB pulmonar ou laríngea. Quando inalados, os bacilos chegam

aos alvéolos pulmonares, onde originam a lesão primária da TB (ADLER & ROSE, 1996; HAAS & DES PREZ, 1990).

Vários fatores influenciam a transmissão da doença, como a quantidade de partículas infecciosas liberadas pelo doente, através de aerossóis, o tempo de contato com o indivíduo infectado, a viabilidade e a virulência do bacilo, além de fatores relacionados ao ambiente (aglomeração, ventilação, umidade, luz solar). O indivíduo com a forma pulmonar da doença cujo exame baciloscópico de escarro apresente bacilos álcool-ácidos resistentes (baciloscopia positiva) é denominado **bacilífero**. Estes doentes eliminam grande quantidade de bacilos para o meio exterior e são a principal fonte de infecção da tuberculose (LOUDON *et al.*, 1969; LOUDON *et al.*, 1968).

1.3 O agente etiológico

Os bacilos que causam a tuberculose estão agrupados no Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por *M. tuberculosis*, responsável pela maioria dos casos de TB humana; *M. bovis*, causador da doença em gado e eventualmente pode acometer outros tipos de animais, inclusive o homem; a cepa atenuada *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guérin), utilizada para vacinação; *M. africanum*, um grupo heterogêneo de isolados responsáveis por tuberculose na África (METCHOCK *et al.*, 1999); *M. microti*, um patógeno isolado com pouca frequência, causador da doença em imunocomprometidos (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1998); *M. pinnipedii*, isolado em animais marinhos (COUSINS *et al.*, 2003); e as subespécies recentemente identificadas - *M. tuberculosis* subsp. *caprae*, encontrado principalmente em caprinos (ARANAZ *et al.*, 1999) e *M. tuberculosis* subsp. *canetti*, isolado na África e na Europa (MILTGEN *et al.*, 2002).

As micobactérias são bacilos retos ou ligeiramente curvos, com dimensões de 0.2 - 0.6 x 1.0 - 10 µm, imóveis, não esporulados, não encapsulados e aeróbios estritos (METCHOCK *et al.*, 1999). Estas bactérias diferem de outros gêneros bacterianos em uma série de propriedades, algumas diretamente relacionadas com a quantidade

e tipos de lipídeos presentes em sua parede celular. Aproximadamente 60% do peso seco de sua parede são devidos a ácidos graxos (LEDERER *et al.*, 1975; ASSELINEAU & LEDERER, 1950), que formam uma barreira hidrofóbica que lhes conferem uma resistência peculiar à dessecação, a diversos agentes químicos e antibióticos e à descoloração por álcool e ácido, evidenciada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen (KENT & KUBICA, 1985). O *M. tuberculosis* tem um tempo de geração longo, entre 15 e 22 horas. De acordo com o meio de cultura empregado, podem ser necessárias até 8 semanas de incubação para a visualização de colônias no meio de cultura (METCHOCK *et al.*, 1999). Este crescimento lento forma a base para a natureza crônica da infecção, com diagnóstico microbiológico demorado e de tratamento prolongado (KAUFMANN, 2001).

1.4 Diagnóstico da tuberculose pulmonar

1.4.1 Diagnóstico clínico

Dependendo da evolução da doença, o paciente pode ser assintomático ou manifestar-se clinicamente com tosse, febre, perda de peso, sudorese noturna e inapetência. A febre apresenta uma variação ao longo do dia. Geralmente, é baixa ou normal durante a manhã, aumentando gradativamente até o final da tarde. À noite, a temperatura volta ao normal e é acompanhada de sudorese. A tosse está presente na maioria dos casos, sendo inicialmente seca. Conforme a doença progride, evolui para uma expectoração purulenta. Ocasionalmente, em função da extensão do processo patológico, o escarro pode estar acompanhado de sangue (hemoptise), o que evidencia um comprometimento de vasos pulmonares, principalmente de artérias. O volume do sangramento é variável e não indica necessariamente uma tuberculose ativa (GARAY, 2004). A tosse com expectoração por mais de três semanas é um sinal importante, e caracteriza o **paciente sintomático respiratório** (BRASIL, 2002).

Todos esses sintomas e sinais são inespecíficos, podendo estar relacionados a doenças coexistentes, o que dificulta o diagnóstico e retarda o tratamento, principalmente em coinfectados com o HIV (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000).

1.4.2 Diagnóstico radiológico

A maioria dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresenta alterações radiográficas sugestivas (GARAY, 2004; BRASIL, 2002). Na TB primária, o processo infeccioso recente é visto geralmente como um infiltrado no lobo médio ou inferior do pulmão (MCGUINNESS & RUBINOWITZ, 2004; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). A imagem radiográfica sugestiva é o aspecto bipolar, de aumento hilar, em decorrência da hipertrofia dos linfonodos regionais, conseqüência da disseminação linfática do foco de Ghon. A principal alteração parenquimatosa é representada por uma opacidade, com limites mal definidos, freqüentemente associada com adenopatia hilar ipsi-lateral. Raramente, os linfonodos aumentados podem comprimir os brônquios, dando origem a atelectasias (GARAY, 2004). Com a progressão da doença, imagens cavitárias podem surgir, indicando uma forma mais grave. As lesões podem regredir espontaneamente, resultando em seqüelas como alterações parenquimatosas calcificadas ou não. Os principais linfonodos acometidos são os da região paratraqueal e hilar direita (BRASIL, 2002).

A apresentação radiográfica mais comum da reativação de uma infecção latente é a presença de infiltrados nos segmentos apicais dos lobos inferiores ou dorsais dos lobos superiores, em um ou ambos os pulmões, acompanhados de um processo inflamatório de tamanho variável (BRASIL, 2002; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). A lesão inicial caracteriza-se por pequenas opacidades nodulares, que tendem a envolver todo o lobo. Conforme a lesão progride, ocorre caseificação de áreas mais ou menos extensas, detectada pelo aparecimento de imagens cavitárias. As cavidades podem ser únicas ou múltiplas, têm parede espessa e representam o achado radiográfico mais importante nessa forma da doença. Frequentemente, a formação de cavidades causa a disseminação brônquica dos bacilos, manifestada

por opacidades acinares, denominadas lesões satélites, presentes na radiografia de 50% dos casos. A presença de calcificação no infiltrado não significa necessariamente doença inativa (GARAY, 2004).

1.4.3 Diagnóstico microbiológico

Atualmente, a confirmação do diagnóstico de tuberculose é feita somente através do exame bacteriológico, que consiste na detecção, isolamento e identificação da micobactéria a partir de espécimes clínicos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; TENOVER *et al.*, 1993). Os métodos convencionais incluem a baciloscopia e a cultura, que consiste no isolamento do microrganismo a partir de espécimes clínicos. A baciloscopia apresenta baixa sensibilidade, porém, é uma técnica simples, de baixo custo e rápida. A cultura é indispensável para a identificação do bacilo e o estudo do padrão de sensibilidade aos quimioterápicos. No entanto, a maior desvantagem do cultivo do patógeno é a demora na obtenção de resultados (DROBNIOWSKI *et al.*, 2003).

1.4.3.1 Baciloscopia

A detecção microscópica de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) é a primeira evidência bacteriológica da presença de micobactérias no material clínico analisado. A baciloscopia fornece uma estimativa do número de bacilos eliminados pelo doente e é uma ferramenta importante no controle da transmissão da doença (WATTERSON & DROBNIOWSKI, 2000; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). As técnicas utilizadas para corar o bacilo baseiam-se na capacidade de sua parede celular reter o corante, resistindo à descoloração com uma solução de ácido clorídrico em álcool. O método de Ziehl-Neelsen é o mais usado e, juntamente com a técnica de Kinyoun, utiliza o corante carbol-fucsina. Essas técnicas devem ser visualizadas em objetiva de grande aumento, sendo necessário o exame mínimo de 300 campos microscópicos, antes da pesquisa de BAAR ser considerada negativa (KENT & KUBICA, 1985). Métodos que utilizam corante fluorescente, como

auramina-rodamina ou auramina O, podem ser examinados com objetiva de menor aumento, permitindo a observação de um número maior de campos microscópicos (METCHOCK *et al.*, 1999). Assim, a baciloscopia feita a partir de corantes fluorescentes é mais rápida que os métodos que utilizam o corante carbol-fucsina (HANNA, 2004; BA & RIEDER, 1999). Entretanto, essa técnica requer microscópio de fluorescência, equipamento caro e não disponível na maioria dos laboratórios do país (BRASIL, 2004).

Apesar das vantagens da baciloscopia, a técnica tem limitações referentes à baixa sensibilidade e especificidade limitada. Para que um exame seja positivo, é necessário um número mínimo de 5.000 bacilos por mililitro de secreção (HOBBY *et al.*, 1973). Esta concentração de bacilos é alcançada apenas em lesões razoavelmente extensas. Doentes com infiltrados iniciais raramente apresentarão exame positivo (GARAY, 2004). Em casos de tuberculose pulmonar, a sensibilidade da baciloscopia varia entre 33% e 80% (GOESSENS *et al.*, 2005; PETERSON *et al.*, 1999; LIPSKY *et al.*, 1984; BURDASH *et al.*, 1976), dependendo da metodologia empregada e da prevalência local da doença. O método também não distingue o *M. tuberculosis* de outras micobactérias, sendo necessárias outras técnicas para o diagnóstico definitivo (GARG *et al.*, 2003).

1.4.3.2 Cultura

O isolamento e a identificação do *M. tuberculosis* através da cultura de espécimes clínicos é a metodologia que permite a confirmação do diagnóstico, sendo por isso considerado o padrão ouro para o diagnóstico de tuberculose (KENT & KUBICA, 1985). A cultura é capaz de detectar entre 10 e 100 bacilos viáveis por mililitro de secreção, sendo, portanto, mais sensível que a baciloscopia, além de permitir o isolamento da micobactéria, necessário para a identificação da espécie e para o teste de sensibilidade às drogas (PALOMINO, 2005). A sensibilidade da cultura varia entre 80% e 85% (STAGER *et al.*, 1991; MORGAN *et al.*, 1983; ROBERTS *et al.*, 1983), e sua especificidade é de 98% (SCHIRM *et al.*, 1995).

O isolamento do bacilo requer cuidados específicos, visto que grande parte dos espécimes analisados contém outros microrganismos, além das micobactérias. A desproporção entre a velocidade de crescimento das micobactérias e das outras bactérias torna necessária uma descontaminação prévia de espécimes clínicos contendo flora associada, que, quando presente, pode impedir a multiplicação dos bacilos (BUIJTELS & PETIT, 2005). Além deste procedimento, alguns materiais biológicos, como o escarro, devem ser tratados com um agente mucolítico, para liquefazer os restos orgânicos e liberar os bacilos intracelulares. O método que utiliza N-acetil-L-cisteína a 2% com hidróxido de sódio (NALC-NaOH) associa um agente descontaminante a um mucolítico e é o mais empregado. Espécimes clínicos provenientes de locais normalmente estéreis devem ser inoculados diretamente no meio de cultura. Antes de serem cultivados, os bacilos devem também ser concentrados por centrifugação (KENT & KUBICA, 1985).

Existem disponíveis vários meios de cultura para micobactérias. Nos meios sólidos à base de ovo, como o meio de Löwenstein-Jensen ou de Ogawa, o crescimento micobacteriano possibilita a avaliação das características morfológicas das colônias (LIU *et al.*, 1973). Entretanto, em meios sólidos à base de ágar, como alguns meios de Middlebrook (7H10 e 7H11), o isolamento dos bacilos é mais rápido. Menor tempo de crescimento é alcançado com a utilização de meios líquidos, como os Middlebrook 7H9 e 7H12 (SOMOSKOVI & MAGYAR, 1999). Porém, a utilização destes meios para o isolamento primário a partir de espécimes não estéreis requer a adição de antibióticos, além de não possibilitarem a observação da morfologia das colônias (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). O meio mais utilizado no Brasil é o Löwenstein-Jensen. Neste meio, são necessárias entre 3 e 6 semanas de incubação para obtenção de crescimento adequado para os testes de identificação do *M. tuberculosis* (KENT & KUBICA, 1985).

O uso de métodos automatizados ou semi-automatizados tem diminuído consideravelmente o tempo de detecção do crescimento micobacteriano (THORPE *et al.*, 1990; MORGAN *et al.*, 1983). Esses sistemas utilizam um meio líquido e o crescimento do microrganismo é detectado através de métodos radiométricos ou não-radiométricos.

O sistema semi-automatizado BACTEC 460 TB[®] (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD), desenvolvido em 1977, utiliza o meio Middlebrook 7H12 contendo ácido palmítico marcado com um radioisótopo do carbono (¹⁴C), denominado meio **BACTEC 12B**. Durante o crescimento, o bacilo utiliza o ácido palmítico em seu metabolismo, liberando o dióxido de carbono radioativo (¹⁴CO₂). O equipamento converte a concentração de ¹⁴CO₂ em índices de crescimento (IC), indicando que houve crescimento microbiano, o que ocorre entre 7 e 14 dias (MORGAN *et al.*, 1983; ROBERTS *et al.*, 1983). Este método foi validado internacionalmente e é aprovado pela Organização Mundial da Saúde . Pode ser empregado para a pesquisa do bacilo em todos os espécimes clínicos, incluindo sangue. A identificação e o teste de sensibilidade do bacilo às drogas podem ser feitos diretamente no meio BACTEC 12B (LASZLO & SIDDIQI, 1984; MORGAN *et al.*, 1983; ROBERTS *et al.*, 1983).

Outros métodos baseiam-se na detecção não radiométrica do crescimento micobacteriano, como os sistemas MB/BactT (Organon Teknika, Durham, NC), MGIT[™] (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*, BBL[®], Becton Dickinson, Cockeysville, MD) e ESP[®] II (Trek Diagnostic Systems, Westlake, OH). O sistema MGIT[™] tem como princípio a detecção do consumo de oxigênio (O₂) por fluorescência, como indicador de crescimento micobacteriano. O tubo BBL MGIT[™] contém meio Middlebrook 7H9 modificado e possui uma base de silicone impregnada com um composto fluorescente sensível à presença de oxigênio, o rutênio. Este metal é o indicador do crescimento da micobactéria, cujo metabolismo causa a diminuição da concentração de oxigênio no meio, resultando na emissão de fluorescência. A fusão da tecnologia BACTEC com o MGIT resultou no sistema BACTEC[™] MGIT[™] 960 (BM960, Becton Dickinson Microbiology Systems), que tem a capacidade de incubação de até 960 culturas, com monitoramento contínuo. O tempo de detecção do crescimento bacteriano é comparável ao obtido pelo BACTEC 460 TB (CRUCIANI *et al.*, 2004). Apesar de ter sido validado internacionalmente , o método apresenta altas taxas de contaminação, entre 7% e 15% (LEE *et al.*, 2003; LEITRITZ *et al.*, 2001; CORNFIELD *et al.*, 1997; PALACI *et al.*, 1996). Outros fatores ainda limitantes da utilização desse método são o custo elevado e a impossibilidade de identificação das micobactérias detectadas.

Muitos estudos têm avaliado o desempenho dos diferentes sistemas de cultura disponíveis. O BACTEC 460 TB[®] continua sendo o sistema mais rápido e sensível, seguido pelos sistemas automatizados de detecção não radiométrica (CRUCIANI *et al.*, 2004; LEITRITZ *et al.*, 2001; CORNFIELD *et al.*, 1997; CASAL *et al.*, 1997). No entanto, a utilização dos métodos rápidos não dispensa o cultivo em meio sólido. Este deve ser feito concomitantemente, pois garante o isolamento de micobactérias que não crescem em outros meios, além de permitir a visualização da morfologia da colônia e preservar o microrganismo para estudos posteriores (HANNA, 2004; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; STAGER *et al.*, 1991; MORGAN *et al.*, 1983).

1.4.3.3 Identificação fenotípica

Após a detecção do crescimento bacteriano, deve-se identificar a micobactéria isolada, diferenciando-a entre o Complexo *M. tuberculosis* e micobactérias não causadoras de tuberculose (NTM, do termo inglês *non-tuberculosis mycobacteria*) (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). Os métodos convencionais de identificação das micobactérias baseiam-se nos aspectos fenotípicos, como caracterização morfológica, bioquímica e crescimento em presença de agentes inibidores. Uma identificação presuntiva pode ser feita através da observação da temperatura e tempo de crescimento, da morfologia das colônias e da produção de pigmentos. O crescimento do *M. tuberculosis* em meio à base de ovo é lento, sendo que a visualização de colônias ocorre em torno de 21 dias. As colônias são rugosas, opacas e de cor bege. Não ocorre produção de pigmentos, mesmo após exposição à luz (RUNYON, 1970).

Várias provas bioquímicas identificam o *M. tuberculosis* (Tabela 1). O teste para detecção da niacina é o mais utilizado, juntamente com o teste de detecção da nitrato-reductase e da produção de catalase (WAYNE & DOUBEK, 1968). A capacidade das micobactérias crescerem em meios contendo agentes inibidores seletivos é utilizada como ferramenta para a identificação das diferentes espécies. O crescimento de bactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* é inibido em

meios contendo 500 µg/mL de ácido p-nitrobenzóico (PNB), o que não ocorre com outras micobactérias. A distinção entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* pode ser feita através do uso de meios contendo 5µg/mL de hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH), onde ocorre a inibição do crescimento do *M. bovis* (GIAMPAGLIA *et al.*, 2005). Apesar de amplamente utilizados, esses métodos são demorados, pois requerem um crescimento bacteriano em meio sólido suficiente para uma identificação correta, o que pode demorar entre 4 e 8 semanas a partir da cultura primária (WOODS, 2002).

Tabela 1 - Diferenciação entre o Complexo *M. tuberculosis* e micobactérias não causadoras de tuberculose (NTM)

Identificação	Suscetibilidade			Atividade de nitratoreductase	Produção de pigmento	Niacina
	PNB	TCH	NAP			
Complexo <i>M. tuberculosis</i> :						
<i>M. tuberculosis</i>	Sensível	Resistente	Sensível	Positiva	Ausente	Positiva
<i>M. bovis</i>	Sensível	Sensível	Sensível	Negativa	Ausente	Negativa
<i>M. africanum</i>	Sensível	Variável	Sensível	Negativa	Ausente	Negativa
NTM	Resistente	Resistente	Resistente	Variável	Variável	Negativa (maioria)

Uma rápida identificação de micobactérias pode ser feita a partir do meio de cultura líquido BACTEC 12B, utilizando-se o teste BACTEC NAP. O p-nitro-α-acetilamino-β-hidroxipropiofenona (NAP) é um composto intermediário da síntese do cloranfenicol e, a uma concentração de 5µg/mL, inibe seletivamente o crescimento de bacilos pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*, havendo pouca ou nenhuma inibição sobre outras micobactérias. A bactéria sensível ao NAP é incapaz de metabolizar em sua presença, o que causa pouca liberação de ¹⁴CO₂. Conseqüentemente, a leitura do meio BACTEC NAP pelo sistema BACTEC 460 TB[®] apresentará uma diminuição significativa no índice de crescimento bacteriano (SIDDIQI, 1989). A presença de culturas mistas ou de outros microrganismos que não micobactérias deverá ser excluída através de microscopia pelo método de Ziehl-Neelsen. Em 1984, LASZLO & SIDDIQI avaliaram o desempenho dessa técnica para diferenciar

bactérias do Complexo *M. tuberculosis* de outras micobactérias. O método mostrou-se rápido e eficaz, fornecendo resultados dentro de 4 dias.

1.4.4 Diagnóstico molecular

1.4.4.1 Métodos de amplificação de ácidos nucleicos a partir de espécimes clínicos

Nas últimas décadas, pesquisas na área da biologia molecular criaram oportunidades para o desenvolvimento de novos métodos aplicados ao diagnóstico de doenças infecciosas (WOLK *et al.*, 2001; TANG & PERSING, 1999). As técnicas moleculares baseiam-se na detecção de uma seqüência alvo específica do DNA ou RNA do patógeno, através de sua ligação (hibridação) a uma seqüência complementar, formando um híbrido. Com as vantagens de serem muito sensíveis e rápidos, os métodos moleculares surgiram como alternativa promissora para a detecção e identificação de *M. tuberculosis*.

Desenvolvida em 1983 por Kary B. Mullis, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que permite a amplificação de segmentos de DNA, levando à produção de grande quantidade deste fragmento. Essa técnica revolucionou as pesquisas na área de biologia molecular e lançou uma ampla e nova perspectiva no estudo de várias doenças (WOLK *et al.*, 2001). Na tuberculose, a aplicação da PCR e de técnicas nela baseadas dá-se em qualquer área, desde a epidemiologia até a prevenção, sendo especialmente relevante no diagnóstico (PALOMINO, 2005).

Para a utilização da técnica de PCR, é necessária a identificação de seqüências-alvo específicas para a amplificação. Para o estudo da tuberculose, foram desenvolvidos vários *primers*, que são oligonucleotídeos sintéticos, direcionados a diferentes regiões do genoma micobacteriano, presentes em qualquer bactéria do gênero *Mycobacterium* ou apenas em membros do Complexo *M. tuberculosis* (SOINI & VILJANEN, 1992; THIERRY *et al.*, 1990b; BRISSON-NOËL *et al.*, 1989; EISENACH *et al.*, 1988).

Uma seqüência repetitiva presente exclusivamente no DNA de bactérias do Complexo *M. tuberculosis*, de significado funcional desconhecido, foi descrita por THIERRY *et al.* (1990a). Esta seqüência, denominada IS6110, pertence a uma classe de moléculas chamadas transposons, que são fitas de DNA capazes de auto-replicação e que podem se integrar permanentemente ao genoma do hospedeiro. O DNA do *M. tuberculosis* apresenta entre 10 e 20 cópias da seqüência, enquanto apenas uma cópia foi encontrada no genoma de *M. bovis* e *M. bovis* BCG. Algumas espécies de *M. tuberculosis* isoladas no Sudeste Asiático não apresentaram essa seqüência de inserção (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1993; YUEN *et al.*, 1993).

Em 1991, EISENACH *et al.* avaliaram o desempenho da PCR na pesquisa do *M. tuberculosis* diretamente do escarro, a partir da amplificação de um fragmento do IS6110, gerando um *amplicon* de 123 pares de bases (pb). O método apresentou resultados comparáveis aos da cultura, com sensibilidade e especificidade próximas a 100%. Desde então, esta seqüência tem sido amplamente utilizada para pesquisa molecular de bactérias do Complexo *M. tuberculosis* (SAVELKOUL *et al.*, 2005; VAN EMBDEN *et al.*, 1993).

Visando avaliar a presença das seqüências de DNA alvo, relatadas na literatura, em cepas de *M. tuberculosis* existentes no estado do Amazonas (Brasil), OGUSKU & SALEM (2004) analisaram a utilização de *primers* específicos para as seqüências IS6110 e para os genes que codificam os antígenos de 68kDa, 38kDa e MPB64. Todas as seqüências alvo foram encontradas no genoma das cepas de *M. tuberculosis* analisadas. Os *primers* específicos utilizados para amplificação do fragmento 123pb da seqüência IS6110 demonstraram maior eficiência no diagnóstico da tuberculose pulmonar. Os autores concluíram que estes *primers* são os mais indicados, naquela região, para a realização da PCR em amostras clínicas e em cepas de *M. tuberculosis* visando o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Os testes de amplificação do ácido nucléico podem ser realizados a partir da utilização de *kits* comerciais ou através da PCR *in-house*, cujo protocolo é desenvolvido pelo próprio laboratório. Algumas técnicas para a pesquisa direta do Complexo *M. tuberculosis*, a partir de material biológico, foram desenvolvidas comercialmente (SU, 2002), como o AMPLICOR[®] MTB Test (Roche Molecular

Systems, NJ, EUA), que amplifica uma seqüência específica do *M. tuberculosis*, presente no gene do RNA ribossomal 16S (BÖDDINGHAUS *et al.*, 1990). O Amplified MTD[®] Test (Gen-Probe, CA, EUA) utiliza a enzima transcriptase reversa para transcrição do RNA ribossomal e detecta o segmento transcrito através de PCR (ABE *et al.*, 1993). Os dois testes apresentam altas especificidade e sensibilidade quando realizados em amostras de pacientes bacilíferos. No entanto, apenas o Amplified MTD[®] apresenta sensibilidade satisfatória para ser utilizado a partir de espécimes com baciloscopia negativa (MICHOS *et al.*, 2006; PIERSIMONI & SCARPARO, 2003; WATTERSON & DROBNIIEWSKI, 2000).

O desempenho das diversas técnicas de PCR para a detecção direta do DNA de *M. tuberculosis* em materiais biológicos não é homogêneo. A baixa sensibilidade encontrada se deve, sobretudo, à presença de substâncias inibidoras da amplificação nos espécimes analisados (SARMIENTO *et al.*, 2003; FORBES & HICKS, 1996). As variações encontradas nos testes de PCR *in house* são devidas, principalmente, a diferenças metodológicas, como o preparo da amostra e o *primer* utilizado (FLORES *et al.*, 2005; NOORDHOEK *et al.*, 1996; NOORDHOEK *et al.*, 1994; CLARRIDGE *et al.*, 1993).

1.4.4.2 Métodos moleculares de identificação a partir do cultivo de micobactérias

Técnicas de biologia molecular para detecção e identificação de micobactérias em meios de cultura têm sido aplicadas nos últimos anos, sobretudo em países desenvolvidos, com o intuito de reduzir o tempo do diagnóstico das doenças causadas por estes microrganismos. Dentre os métodos utilizados, encontram-se a PCR *in house*, com adaptações para uso no próprio laboratório, e os métodos comerciais baseados na PCR ou na hibridação de ácidos nucléicos. O principal método comercial designado AccuProbe[®] System (AccuProbe[®] *M. tuberculosis* Complex Culture Identification Test, Gen-Probe, CA, EUA) utiliza uma sonda de DNA marcada, complementar a um fragmento do RNA ribossômico específico de micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*. Este método apresenta

sensibilidade e especificidade elevadas (BADAK *et al.*, 1999), porém, requer uma quantidade mínima de 10^5 microrganismos (HALE *et al.*, 2001; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000), não pode ser utilizado em culturas mistas e seu custo financeiro é relativamente elevado (BRASIL, 2004; DOWDY *et al.*, 2003; WOODS, 2002; TANG & PERSING, 1999). Além destes, outros inconvenientes relacionados à especificidade do teste também têm sido relatados. Utilizando sondas de DNA específicas para o Complexo *M. tuberculosis*, LIM *et al.* (1991) identificaram corretamente 62 culturas de *M. tuberculosis* e 11 de *M. bovis*. Entretanto, 2 cepas de *M. terrae* e uma do Complexo *M. avium* apresentaram resultado positivo para Complexo *M. tuberculosis*. Em um estudo feito por BUTLER *et al.* (1994), o sistema AccuProbe[®] apresentou reação cruzada com 8 das 20 cepas de *Mycobacterium celatum* analisadas. Através do seqüenciamento genético, foi demonstrado que esta bactéria apresenta grande homologia com a sonda usada no teste. Apesar de raramente isolada, evidências clínicas têm indicado que a espécie *M. celatum*, pode causar uma doença fatal, tanto em pacientes imunocompetentes quanto em imunossuprimidos (BUX-GEWEHR *et al.*, 1998; TORTOLI *et al.*, 1995), o que acentua a relevância dos resultados falso-positivos encontrados pelos pesquisadores.

Além dos métodos de hibridação de ácidos nucléicos, outros métodos comerciais baseados na PCR também têm sido utilizados, porém de forma limitada. SMITH *et al.* (1997) empregaram o teste AMPLICOR[®] MTB em culturas de escarros em meios BACTEC 12B, com índices de crescimento iguais ou maiores que 20. Os autores observaram uma excelente sensibilidade e especificidade e uma diminuição significativa no tempo de identificação do *M. tuberculosis*. Contudo, a exemplo do AccuProbe[®] System, esse sistema possui como grande desvantagem seu custo elevado.

Em relação às técnicas *in house* para detecção e identificação de micobactérias a partir de cultivo, embora sejam consideradas extremamente interessantes e promissoras, seu uso é ainda bastante restrito. No Brasil, a partir de um estudo realizado em 2005, LIMA *et al.* afirmaram que o método de PCR *in house* pode ser útil na identificação rápida de *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. intracellulare* em culturas de escarro contaminadas no meio de Löwenstein-Jensen. Já com

referência à utilização de PCR *in house* para identificação do bacilo a partir de meios BACTEC 12B, encontramos apenas quatro estudos na literatura pesquisada (RYANG *et al.*, 1996; FORBES & HICKS, 1994; MORRIS *et al.*, 1994; CORMICAN *et al.*, 1992). Os resultados destes trabalhos apresentaram excelentes sensibilidade e especificidade. No entanto, estes estudos foram limitados a países desenvolvidos.

Desenvolvida com insumos produzidos no próprio laboratório, a PCR *in house* é uma alternativa economicamente viável e relativamente simples, quando comparada aos métodos comerciais de amplificação. Diferentes protocolos de PCR utilizando *primers* específicos para a seqüência de inserção IS6110 têm sido descritos. Muitos apresentaram sensibilidade comparável à da cultura (COHEN *et al.*, 1998; QUEROL *et al.*, 1995; SCHIRM *et al.*, 1995; CLARRIDGE *et al.*, 1993). Entretanto, a difusão da técnica de PCR *in house* tem sido bastante limitada. Há uma grande carência de estudos sobre a avaliação desta técnica e da utilização de *primers* específicos para a seqüência de inserção IS6110, visando a detecção de *M. tuberculosis* em meios de culturas líquido (BACTEC 12B e ou MGIT) em condições de rotina diagnóstica, assim como estudos sobre análise crítica de sua aplicação e condições de uso. Considerando, portanto, que, apesar de eficientes, os métodos moleculares comerciais apresentam um elevado custo econômico, torna-se necessário a avaliação de métodos alternativos de identificação de micobactérias em meios de cultura, com vistas à sua utilização em um maior número de laboratórios de micobacteriologia clínica, sobretudo em países em desenvolvimento.

II. Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR IS6110) na identificação do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em cultura de escarro no meio BACTEC 12B.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a especificidade dos *primers* IS6B e IS7B na amplificação do fragmento de 123 pb da seqüência de inserção IS6110, presente no genoma de espécies pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*.
- Determinar a sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR IS6110 na identificação de *M. tuberculosis* em culturas de escarro no meio BACTEC 12B com índice de crescimento igual ou acima de 30.
- Comparar o tempo necessário para identificação do *M. tuberculosis* através da utilização de técnicas fenotípicas e da PCR IS6110.

III. Material & Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização das amostras

No período entre março de 2004 e março de 2006, foram aleatoriamente selecionadas e analisadas 107 amostras de escarro provenientes de 95 pacientes com suspeita de tuberculose atendidos no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Antonio Cassiano Moraes, Espírito Santo, Brasil, arrolados no protocolo CEPE/CSS-UFES nº DMID01 – 009, “Estudo prospectivo, multicêntrico, controlado, randomizado, para avaliação de esquema encurtado do tratamento padrão da tuberculose de 6 meses para 4 meses, em pacientes HIV-negativos, infectados com cepas sensíveis às drogas, sem doença cavitária e com cultura negativa no segundo mês de tratamento”.

3.2 Coleta das amostras

O número de amostras analisadas baseou-se em um cálculo do tamanho da amostra, para o qual foi utilizado um nível de significância de 5% e um poder do teste de 80%. Através deste cálculo, obtivemos um tamanho de 77 amostras. No entanto, em decorrência do tempo disponível para a conclusão da pesquisa, foram analisadas 107 amostras de escarro dos pacientes selecionados. Os escarros foram coletados em frascos estéreis, sob orientação da equipe de enfermagem, e mantidos entre 2 a 10 °C até o seu processamento no laboratório.

3.3 Exames laboratoriais

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Micobactérias do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob condições de biossegurança.

3.3.1 Digestão e descontaminação das amostras

As amostras de escarro foram submetidas à digestão com ditionotreitól (DTT) a uma concentração final de 0,1%, por 5 min, em um agitador. Posteriormente, foram descontaminadas com igual volume de uma solução citrato de sódio / hidróxido de sódio a uma concentração final de 0.7 / 1.25 %, por 15 min, à temperatura ambiente. Após a descontaminação, foi adicionado, a cada amostra, tampão fosfato (PBS) até um volume final de 50 mL. As amostras foram centrifugadas a 4,000 x *g*, por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 2,0 mL de PBS (KENT & KUBICA, 1985).

3.3.2 Exame microscópico dos esfregaços de escarro (baciloscopia)

Os esfregaços de escarro foram feitos com 30 µL do sedimento das amostras processadas. As lâminas foram coradas pela técnica de Auramina O (COLLINS *et al.*, 1997) e a leitura microscópica foi realizada de acordo com as recomendações do Manual de Bacteriologia da Tuberculose do Ministério da Saúde (Brasil, 1994).

3.3.3 Cultura

3.3.3.1 Cultura em meio de Ogawa

A cultura em meio sólido foi realizada inoculando-se um volume de 0,2 mL do sedimento das amostras processadas em um frasco contendo meio de cultura de Ogawa. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C e examinadas semanalmente para verificação de crescimento microbiano. Após 6 semanas de incubação, as culturas que não apresentaram crescimento de micobactérias foram consideradas negativas (KENT & KUBICA, 1985).

3.3.3.2 Cultura em meio BACTEC 12B (sistema semi-automatizado)

As amostras foram cultivadas pelo método radiométrico BACTEC 460 TB[®], seguindo recomendações do fabricante (SIDDIQI, 1989). Em um frasco de meio BACTEC 12B contendo 0,1mL de solução antimicrobiana PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina), foi inoculado 0,5mL do sedimento das amostras processadas. Os frascos foram incubados a 37°C e a leitura radiométrica foi feita diariamente durante os 14 dias iniciais, através do aparelho BACTEC 460 TB[®] (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD), com a determinação do índice de crescimento microbiano (IC). Depois de 14 dias de incubação, os frascos negativos foram lidos as segundas, quartas e sextas-feiras, até completar 6 semanas, quando as culturas com leitura de IC menor que 30 foram consideradas negativas e descartadas.

3.3.3.2.1 Culturas com crescimento de microrganismos (índice de crescimento igual ou maior a 30)

As culturas em meio BACTEC 12B cujo IC foi igual ou maior a 30 foram examinadas microscopicamente para a verificação da presença de BAAR. O esfregaço foi realizado com 30 µL do meio 12B e foi corado pela técnica de Ziehl-Neelsen (COLLINS, 1997). Uma alíquota de 0,1mL das culturas com IC maior ou igual a 30 foi inoculada em ágar sangue de carneiro a 5%. O meio foi incubado a 37°C durante 24h, quando foi verificado o crescimento de microrganismos contaminantes (fungos e/ou outras bactérias que não micobactérias).

A interpretação das culturas em meio 12B foi feita baseada nos resultados de Ziehl-Neelsen e do crescimento microbiano em placa de ágar sangue (PAS), conforme a seguir:

I - Culturas puras (positivas) - Presença de BAAR ao exame microscópico e ausência de outros microrganismos (contaminantes) em PAS.

II - Culturas mistas (positivas com contaminação) - Presença de BAAR ao exame microscópico e presença de outros microrganismos (contaminantes) em PAS.

III - Culturas contaminadas - Ausência de BAAR ao exame microscópico e presença de outros microrganismos (contaminantes) em PAS.

As culturas mistas foram submetidas à nova descontaminação alcalina. O meio 12B das culturas mistas foi removido e colocado em um tubo de centrifuga de 50mL. Um volume igual de hidróxido de sódio a 6% foi adicionado e a amostra foi agitada periodicamente durante 20 min. Posteriormente, o volume foi completado para 50mL com tampão fosfato (PBS). O tubo foi homogeneizado por inversão e centrifugado a 3.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi descartado. Ao sedimento foi adicionado 0,5mL de PBS. O tubo foi agitado e a suspensão foi inoculada em um novo frasco de

meio 12B adicionado de PANTA, seguindo os procedimentos de incubação e leitura conforme item 3.3.3.2.

3.3.4 Identificação do *Mycobacterium tuberculosis* por métodos fenotípicos

3.3.4.1 Aspectos fenotípicos das colônias

Para todas as culturas com crescimento de micobactérias em meio de Ogawa foi realizada uma análise fenotípica baseada nas seguintes características: aspecto morfológico, pigmentação e tempo de crescimento das colônias.

3.3.4.2 Inibição do crescimento bacteriano em presença de ácido *p*-nitrobenzóico (PNB) e ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH)

Todas as culturas puras (positivas) de BACTEC 12B foram identificadas através da avaliação da inibição do crescimento bacteriano em presença de PNB e TCH. As drogas foram adicionadas separadamente em meio Ogawa, a uma concentração final de 500 µg/mL de PNB e 5 µg/mL de TCH. Três frascos de meio de Ogawa receberam um inóculo de 0,2 mL da cultura positiva. Dois meios continham PNB ou TCH. O terceiro meio foi usado como controle e não continha agente inibidor. As culturas foram incubadas a 37°C e observadas a partir do 12º dia de inoculação. Foram identificadas como *M. tuberculosis* as bactérias que apresentaram crescimento no frasco controle, um padrão similar de crescimento no meio contendo TCH e ausência de crescimento no meio contendo PNB (GIAMPAGLIA *et al.*, 2005).

3.3.4.3 Inibição do crescimento bacteriano em presença de p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (NAP)

O teste BACTEC NAP foi realizado com todas as culturas puras de BACTEC 12B, seguindo-se instruções do fabricante (SIDDIQI, 1989). As culturas puras com IC \geq 50 foram diluídas, de acordo com o índice de crescimento apresentado. Um mililitro desta diluição foi inoculado em um frasco vazio contendo um disco de papel impregnado com 5 μ L de p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona. O meio 12B contendo a cultura diluída foi usado como controle. As culturas foram incubadas a 37°C e a leitura radiométrica foi feita diariamente, por até 5 dias. Foram consideradas do Complexo *M. tuberculosis* as bactérias cujo crescimento foi inibido em presença do NAP.

3.3.4.4 Interpretação dos resultados fenotípicos

As cepas selecionadas foram identificadas como *M. tuberculosis*, com base nas características fenotípicas das colônias (rugosas, cremes e opacas), na resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (5 μ g/mL) e nas sensibilidades ao ácido p-nitrobenzóico (500 μ g/mL) e ao p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (KENT & KUBICA, 1985; COLLINS *et al.*, 1997). As culturas que apresentaram crescimento micobacteriano, cuja identificação fenotípica não foi possível, foram excluídas do estudo.

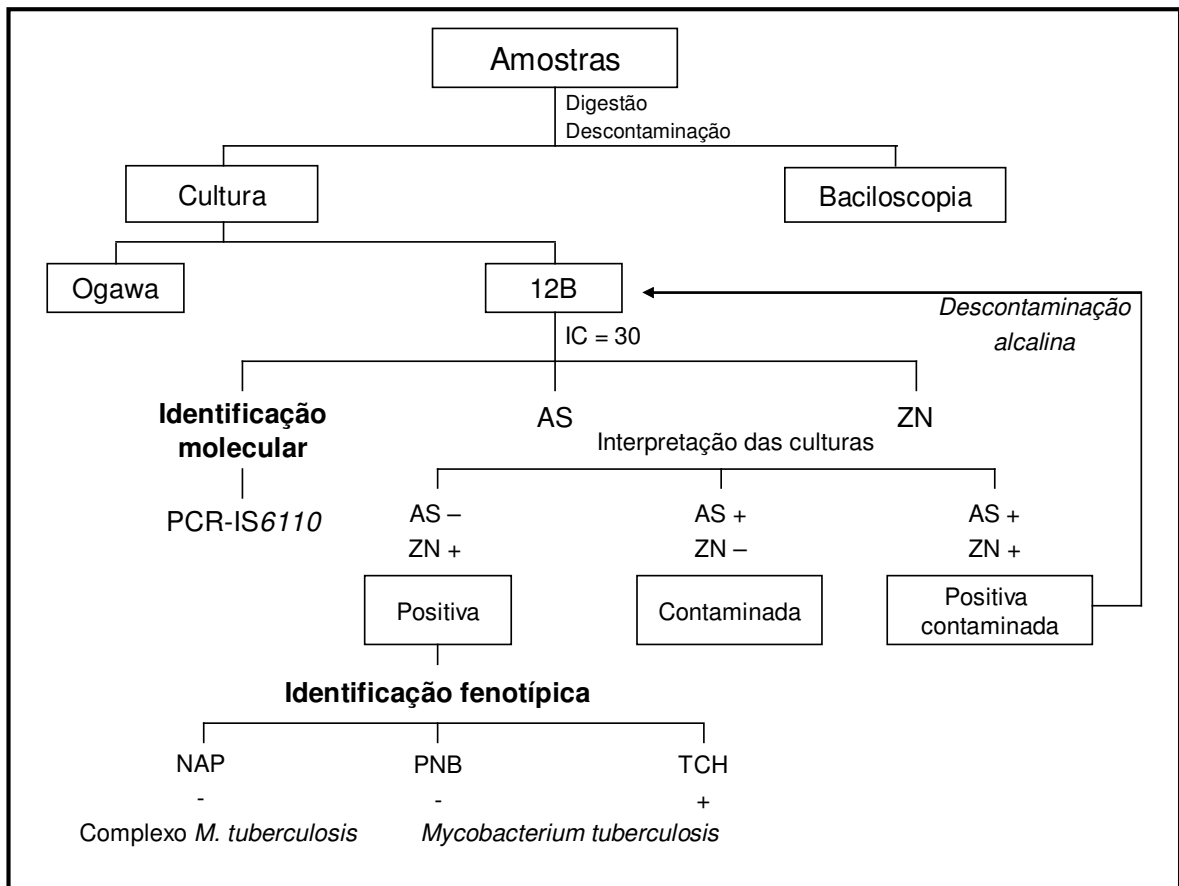


Figura 2 - Algoritmo do processamento das amostras de escarro analisadas. (IC: índice de crescimento; AS: ágar sangue de carneiro; ZN: coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen; + : positivo; - : negativo)

3.3.5 Identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* por método molecular

3.3.5.1 Extração do DNA

Todas as culturas em meio BACTEC 12B que apresentaram crescimento microbiano foram submetidas à amplificação do DNA através da técnica de PCR IS6110. As reações de amplificação foram realizadas a partir das culturas em meio 12B com

índice de crescimento igual ou maior a 30, independentemente do resultado da identificação fenotípica. Uma alíquota de 1,0 mL do meio 12B foi retirada e armazenada a - 20°C até ser realizada a extração do DNA, quando as amostras congeladas foram aquecidas entre 90°C e 100°C, durante 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x *g* por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 5 µL de água estéril. No teste de amplificação foram utilizados 2 µL deste sedimento.

3.3.5.2 Reação em cadeia da polimerase

3.3.5.2.1 Primers

O par de *primers* IS6B (5' GGC TGT GGG TAG CAG ACC 3') e IS7B (5' CGG GTC CAG ATG GCT TGC 3') (Invitrogen) foi usado na amplificação de uma porção da seqüência de inserção IS6110 do genoma das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (Figura 3). Os produtos da amplificação da PCR IS6110 são fragmentos de 123 pares de base (pb).

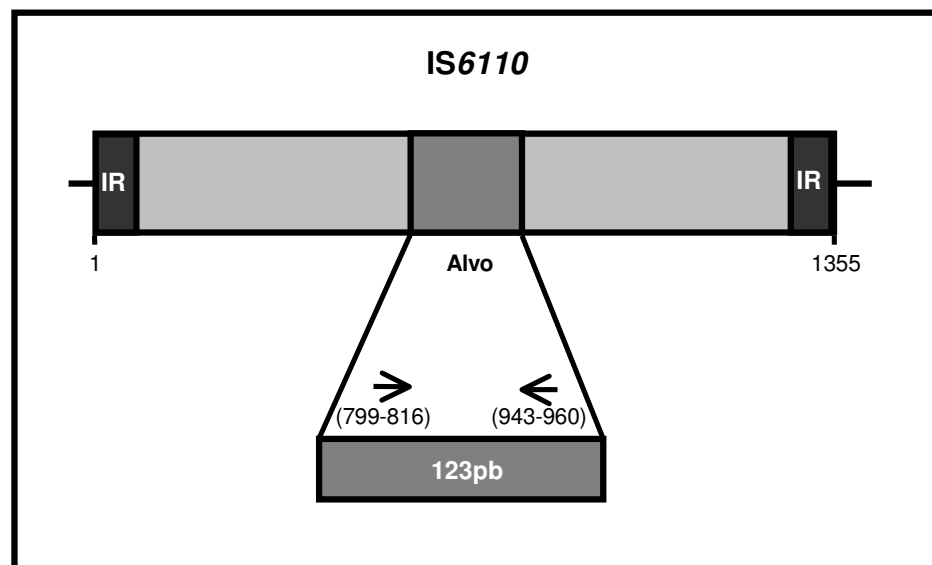


Figura 3 - Seqüência de inserção IS6110, de 1,35kb, presente no genoma de membros do Complexo *M. tuberculosis*. A região da seqüência amplificada pelos primers IS6B e IS7B está demonstrada em destaque. (IR: seqüências terminais de repetição invertida)

3.3.5.2.2 Amplificação pela técnica de PCR IS6110

A amplificação foi realizada em tubos de 0,2 mL, com um volume final de 25 µL por reação, em um termociclador (LCx Thermal Cycler - Abbott Diagnostic Division, Abbott Park, IL, USA). Cada tubo de reação continha 2 µL do DNA extraído, 5 pmol de cada *primer*, 4mM MgCl₂, 2,5 µL de tampão 10X (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), 0,1mg/mL de soro albumina bovina (BSA), 200 µm de cada dATP, dTTP, dCTP e dGTP e 1,25U de Taq DNA polimerase (CENBIOT, Brasil), cobertos com 10 µL de óleo mineral estéril. O termociclador foi programado para fazer a PCR usando as seguintes condições: 94°C por 5 min, 34 ciclos de 94°C por 30 seg, 65 °C por 30 seg e 72°C por 45 seg, com uma extensão final a 72°C por 10 min. Como controles negativos e positivos da reação foram utilizadas, respectivamente, culturas das cepas de referência *Escherichia coli* (ATCC 29522) e de *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) em meio 12B.

3.3.5.2.3 Detecção do produto amplificado

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% com 10 µL do produto da reação de amplificação. Os géis foram corados com brometo de etídeo (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), visualizados e fotografados em um transiluminador de luz ultravioleta (Eagle eye II – Stratagene, CA, USA). O tamanho do *amplicon* (123pb) foi comparado com um marcador de DNA (100bp DNA ladder - Gibco®) onde cada fragmento é separado por uma diferença de 100 pb. O resultado da reação de amplificação foi considerado positivo para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* quando um produto de 123pb do IS6110 estava presente no gel (PCR positiva).

A análise da concordância entre os métodos de identificação fenotípico e molecular foi realizada através da estatística *kappa* (k) com grau de confiança de 95%. Os dados foram analisados no programa STATA 6,0. Foram também calculadas a

sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR IS6110 em relação à identificação fenotípica.

3.3.5.3 Avaliação prévia da técnica de PCR IS6110

Antes de serem realizadas as identificações moleculares das culturas de escarro provenientes dos pacientes incluídos no estudo, foram realizados experimentos com o objetivo de avaliar, previamente, a especificidade dos *primers* utilizados e a capacidade da técnica de PCR IS6110 em detectar o DNA de microrganismos do Complexo *M. tuberculosis* em meio BACTEC 12B. Para este objetivo, foram utilizadas as cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e as reações de amplificação foram realizadas seguindo-se os procedimentos descritos no item 3.3.5.2.

3.3.5.3.1 Avaliação da especificidade dos *primers*

A avaliação da especificidade dos *primers* empregados na técnica de amplificação foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na aplicação da técnica da PCR IS6110 em amostras de diferentes espécies bacterianas puras. Inicialmente, foram cultivadas em meio de Ogawa cepas de *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177), *M. africanum* (ATCC 25420), *M. bovis* (ATCC 35721), *M. chelonae* (ATCC 35752), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. marinum* (ATCC 927); e em meio de MacConkey a cepa de referência de *Escherichia coli* (ATCC 29522). A partir destes cultivos, foram feitas suspensões equivalentes ao padrão nº 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias/mL). Um volume de 0,05mL de cada suspensão foi inoculado em frascos individuais de meio 12B, com exceção do *M. tuberculosis* H37Ra, que foi inoculado em cinco frascos do meio, sendo utilizado 0,2mL da suspensão. Todos os meios foram cultivados e lidos pelo método radiométrico BACTEC 460 TB[®], conforme item 3.3.3.2. As culturas foram

submetidas à amplificação do DNA através da técnica de PCR IS6110 (item 3.3.5.2) apresentando os seguintes índices de crescimento: *M. africanum* (IC de 146 e 774), *M. chelonae* (IC de 61 e 375), *M. kansasii* (IC de 502 e 536), *M. marinum* (IC de 54 e 297), H37Ra (IC de 41 e 117), *M. bovis* (IC de 370) e *E. coli* (IC de 381).

A segunda etapa consistiu na aplicação da técnica PCR IS6110 em amostras contendo *M. tuberculosis* e uma outra espécie bacteriana. Para obtenção deste tipo de cultura mista, uma alíquota de cada cultura bacteriana descrita anteriormente foi transferida para um microtubo e, a esta suspensão, foi adicionado um volume de 0,1 mL de uma cultura de H37Ra em meio de BACTEC 12B (IC=50). As culturas mistas obtidas foram novamente cultivadas e lidas pelo método radiométrico BACTEC 460 TB[®], conforme item 3.3.3.2. A reação de amplificação foi realizada a partir de alíquotas dessas culturas, cujos índices de crescimento variaram de 148 a 451.

3.3.5.3.2 Avaliação da capacidade da PCR IS6110 em detectar *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra em meios BACTEC 12B com diferentes índices de crescimento

Para avaliar a capacidade da técnica de PCR IS6110 em detectar diferentes concentrações do DNA de *M. tuberculosis* em meio BACTEC 12B, foram testados diferentes índices de crescimento (66, 88, 105, 121 e 552) das culturas de H37Ra, descritas no item 3.3.5.3.1. Após a extração do DNA, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x *g* por 2 minutos. Para essa avaliação, o sobrenadante do DNA extraído não foi descartado e a reação de amplificação foi realizada em alíquotas tanto do sedimento quanto do sobrenadante dessas culturas.

IV. Resultados

4 RESULTADOS

Para avaliar a especificidade dos *primers* e a capacidade da técnica de PCR IS6110 em detectar o DNA das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* em meio BACTEC 12B, realizou-se os ensaios do estudo em duas etapas. A primeira etapa constituiu-se da análise prévia da PCR IS6110, com cepas de referência de *Escherichia coli* e de micobactérias, e a segunda etapa, da análise da performance da reação em cadeia da polimerase (PCR IS6110) para identificação do *M. tuberculosis* a partir da cultura de escarros em meios BACTEC 12B.

4.1 Avaliação prévia da técnica de PCR IS6110

4.1.1 Avaliação da especificidade dos *primers*

A avaliação da especificidade dos *primers* utilizados foi realizada em duas fases. Inicialmente, a PCR foi realizada a partir do DNA extraído das culturas das cepas de referência H37Ra, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. marinum* e *Escherichia coli*. Como demonstrado na Figura 4, os *primers* utilizados mostraram-se específicos para a amplificação do fragmento de 123pb do IS6110 das micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*. Nenhum resultado de PCR foi positivo nas culturas das demais micobactérias e de *E. coli*. Os índices de crescimento variaram de 54 (*M. marinum*) a 502 (*M. kansasii*).

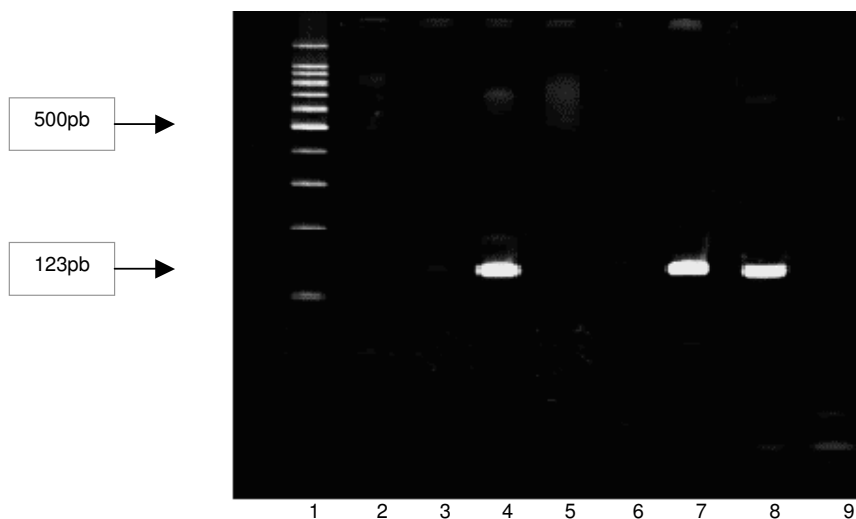


Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% dos produtos amplificados pela reação em cadeia da polimerase. Colunas – 1: marcador de DNA (100pb); 2: controle negativo (água); 3: *M. marinum*; 4: *M. africanum*; 5: *M. kansasii*; 6: *M. chelonae*; 7: *M. bovis*; 8: H37Ra; 9: *E. coli*.

A especificidade dos *primers* IS6B e IS7B foi confirmada através da PCR das culturas mistas obtidas a partir da adição de H37Ra às culturas das cepas de referência descritas acima. O gel de poliacrilamida apresentado na Figura 5 mostra a amplificação das culturas das cepas de referência antes e após a adição de H37Ra. A técnica PCR IS6110 detectou e amplificou especificamente o fragmento de DNA de todas as culturas mistas, incluindo as culturas das micobactérias não pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* (*M. chelonae*/H37Ra, *M. kansasii*/H37Ra e *M. marinum*/H37Ra). A cultura mista de *Escherichia coli*/H37Ra também apresentou resultado de PCR positiva.

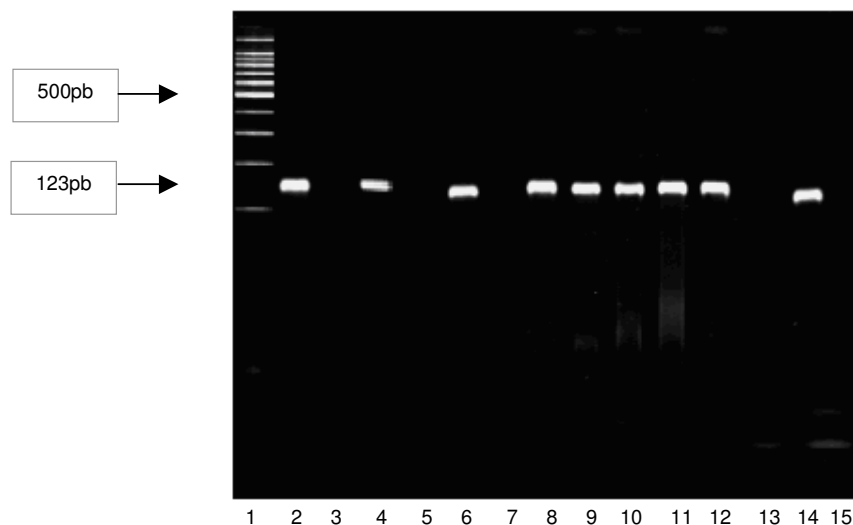


Figura 5 - Resultado da avaliação da especificidade dos *primers* na amplificação do fragmento de 123pb do IS6110. Colunas – 1: marcador de DNA (100pb); 2: *E. coli* / H37Ra ; 3: *E. coli*; 4: *M. marinum* / H37Ra ; 5: *M. marinum*; 6: *M. chelonae* / H37Ra; 7: *M. chelonae*; 8: *M. africanum* / H37Ra; 9: *M. africanum*; 10: *M. bovis* / H37Ra ; 11: *M. bovis*; 12: *M. kansasii* / H37Ra; 13: *M. kansasii*; 14: H37Ra; 15: Controle negativo (água).

4.1.2 Avaliação da capacidade da PCR IS6110 em detectar *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra em meios BACTEC 12B com diferentes índices de crescimento

A capacidade da técnica de PCR IS6110 em detectar microrganismos do Complexo *M. tuberculosis* cultivados em BACTEC 12B foi avaliada a partir da amplificação do DNA presente no sedimento e no sobrenadante das culturas de H37Ra em meio 12B. Diferentes índices de crescimento foram testados, variando de 66 a 552, o que corresponde, aproximadamente, a 1×10^3 e 1×10^6 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), respectivamente (SIDDIQI, 1989). A Figura 6 ilustra o gel de poliácridamida da reação de amplificação das culturas de H37Ra testadas. Com exceção da *E. coli*, todas as amostras apresentaram PCR positiva. A PCR IS6110 mostrou-se sensível para a detecção de DNA no sedimento e no sobrenadante das culturas de H37Ra. As bandas de 123pb apresentadas foram homogêneas em todas as amostras positivas, incluindo o sobrenadante das culturas, independentemente do índice de crescimento analisado.

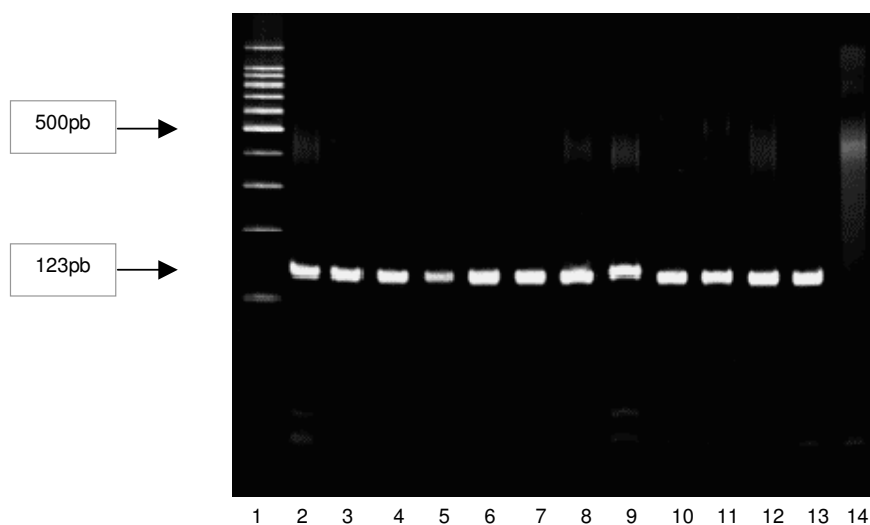


Figura 6 - Resultado da reação de amplificação do DNA de *M. tuberculosis* em meios 12B. Colunas - 1: marcador de DNA (100pb); 2 a 13: sedimento e sobrenadante das culturas de H37Ra em meios 12B com índices de crescimento de 121,105,552,129,66 e 88, respectivamente; 14: *E. coli*.

4.2 Análise do desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR IS6110) para identificação do *M. tuberculosis* a partir da cultura de escarros em meios BACTEC 12B

Um total de 107 amostras de escarro provenientes de 95 pacientes com suspeita de tuberculose foi submetido à baciloscopia e à cultura em meio de Ogawa e BACTEC 12B. O sistema radiométrico BACTEC 460 TB[®] detectou crescimento microbiano em todas as amostras e a amplificação pela técnica da PCR IS6110 foi realizada em todos os meios 12B cujo índice de crescimento foi igual ou maior a 30.

Os resultados de identificação pelos métodos fenotípico e molecular encontram-se na Tabela 2. Das 91 amostras com resultados positivos de PCR, 90 (98,90%) culturas foram identificadas como *Mycobacterium tuberculosis* pelo método fenotípico. Uma amostra (1,10%), identificada como outra micobactéria que não *M. tuberculosis* pelo método fenotípico, apresentou resultado de PCR positivo. Este provável resultado falso positivo ocorreu em uma amostra com IC igual a 65, cujo paciente foi previamente diagnosticado com tuberculose e estava recebendo

tratamento para a doença há dois meses. Dentre as 16 amostras com resultado de PCR negativo, 07 foram identificadas como micobactérias outras que não o *M. tuberculosis* pelo método fenotípico, 07 culturas contaminaram com outros microrganismos e 02 culturas apresentaram crescimento de micobactérias associado a microrganismos contaminantes. Estas duas culturas mistas foram provenientes de dois pacientes com diagnóstico prévio de tuberculose e em tratamento há cinco meses. Apesar de serem novamente descontaminadas e incubadas, as micobactérias não foram isoladas, não sendo possível sua identificação pelo método fenotípico. Como pode ser observado ainda na Tabela 2, das 90 bactérias identificadas como *M. tuberculosis* pelo método fenotípico, todas (100%) apresentaram resultado de PCR positivo. Dentre estes, o fragmento de 123pb do IS6110 foi amplificado diretamente em três (3,33%) culturas mistas de BAAR com microrganismos contaminantes. A identificação fenotípica destas culturas somente foi possível após serem submetidas à nova descontaminação alcalina e incubação por cerca de duas semanas. A técnica da PCR IS6110 apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 93,3% em relação ao método fenotípico de identificação. A estatística de *kappa* (grau de concordância corrigido) foi de 0,96, com uma taxa de concordância de 99,05%.

Tabela 2 - Resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR IS6110) em relação aos microrganismos isolados e identificados, através dos métodos fenotípicos, no meio de cultura BACTEC 12B.

RESULTADO DE PCR	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA		
	<i>M. tuberculosis</i>	Outra micobactéria que não <i>M. tuberculosis</i>	Outros
Positivo	90	1	0
Negativo	0	7	7
TOTAL^a	90	8	7

^a Não incluídas 02 culturas mistas cuja identificação fenotípica não foi possível.
Sensibilidade = 100%
Especificidade = 93,3%

As culturas de meio 12B foram interpretadas de acordo com os resultados de microscopia pelo método de Ziehl-Neelsen, juntamente com a presença de crescimento microbiano em placa de ágar sangue. Das 107 amostras com crescimento microbiano em meio 12B, 94 (87,85%) culturas estavam puras, apresentando somente BAAR à microscopia, 04 (3,74%) amostras apresentaram cultura mista de BAAR com microrganismos contaminantes, 08 (7,48%) apresentaram somente microrganismos contaminantes e em uma (0,93%) não foram visualizados microrganismos à microscopia e à cultura em ágar sangue (Tabela 3). Do total de 107 culturas analisadas, 91 (85,05%) amostras apresentaram resultado de PCR positiva e, destas, 87 (95,60%) culturas apresentaram somente BAAR à microscopia. A técnica detectou e amplificou o fragmento de 123pb do IS6110 em 03 (3,30%) amostras que apresentaram cultura mista de BAAR com outros microrganismos, sendo que, em uma destas foram visualizados somente microrganismos contaminantes ao exame microscópico do meio 12B.

Tabela 3 - Resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR IS6110) em relação ao exame microscópico e índice de crescimento (IC) no meio de cultura BACTEC 12B

EXAME MICROSCÓPICO (meio 12B)	RESULTADO DE PCR					
	Positivo			Negativo		
	intervalo de Índice de crescimento			intervalo de Índice de crescimento		
	30 a 50 ^a	51 a 100 ^b	101 a 600 ^c	30 a 50 ^a	51 a 100 ^b	101 a 600 ^c
BAAR	27	30	30	2	1	4
BAAR + Microrganismos contaminantes	0	1	1	0	0	2
Microrganismos contaminantes	0	1	0	3	2	2
Ausência de microrganismos	1	0	0	0	0	0

^a aproximadamente 1×10^3 CFU/mL

^b aproximadamente 1×10^4 CFU/mL

^c aproximadamente 1×10^6 CFU/mL

* Segundo SIDDIQI (1989)

Como demonstrado na Tabela 3, dentre os 91 resultados de PCR positivos, a técnica de PCR IS6110 foi capaz de detectar e amplificar o DNA de 28 (30,76%) amostras cujo índice de crescimento foi menor que 50, correspondendo aproximadamente a 1×10^3 unidades formadoras de colônias por mililitro (CFU/mL) (SIDDIQI, 1989). Dentre essas 28 culturas está incluída uma cultura de *M. tuberculosis* cuja microscopia do meio 12B não detectou a presença de microrganismos. A PCR também foi positiva em uma cultura de BAAR com microrganismos contaminantes cujo 12B apresentou IC abaixo de 100. A menor e maior leitura de IC com PCR positiva foram 32 e 583, respectivamente.

Das 107 culturas analisadas, a PCR foi negativa em 16 (14,95%) amostras. Dentre essas, 07 (43,75%) apresentaram somente BAAR à microscopia (Tabela 3). Do total de culturas com resultado de PCR negativo, 09 (56,25%) apresentaram microrganismos contaminantes à microscopia, sendo que 02 dessas culturas eram mistas (presença de BAAR e microrganismos contaminantes).

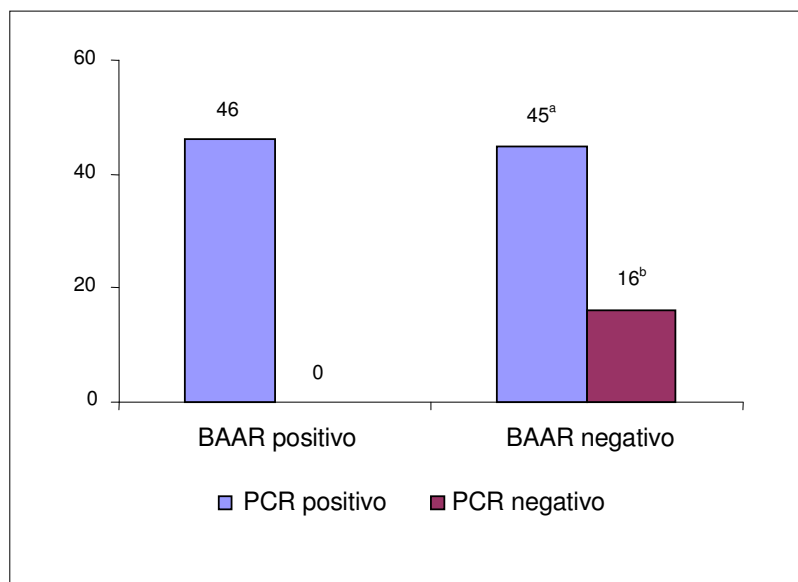
Com o propósito de comparar o tempo necessário para identificação do *M. tuberculosis* pelos métodos fenotípico e molecular foram utilizados os seguintes parâmetros: (i) tempo de identificação do *M. tuberculosis* com base na média de dias para se obter a conclusão dos exames fenotípico (NAP) e molecular a partir da inoculação da amostra no meio de cultura (Tabela 4) e (ii) capacidade da PCR IS6110 de identificar o *M. tuberculosis* em culturas cujos escarros semeados apresentaram resultados de baciloscopia negativos (Gráfico 1). Para ambos os parâmetros, houve diferença significativa entre os métodos ($p < 0,05$). Considerando-se que o teste NAP BACTEC é realizado a partir de meio 12B com IC ≥ 50 e que a identificação do Complexo *M. tuberculosis* é obtida cerca de quatro dias após a inoculação no frasco contendo o NAP (SIDDIQI, 1989), a identificação por intermédio da técnica molecular ocorreu, em média, 9,7 dias antes do que a identificação pelo método fenotípico. Nos casos que em que os meios 12B estavam contaminados com outros microrganismos, ocorreu em média, 14 dias mais rápido do que o método fenotípico.

Tabela 4 - Comparação entre a média de tempo (em dias) para a identificação do *M. tuberculosis* pelos métodos molecular e fenotípico (NAP).

EXAME MICROSCÓPICO (meio 12B)	IDENTIFICAÇÃO DE <i>M. tuberculosis</i>			
	Método molecular ^a		Método fenotípico ^a	
	Positivo	Tempo (dias)	Positivo	Tempo (dias)
BAAR	87	11,6	86	15,5
BAAR + Microrganismos contaminantes	2	10	2 ^b	25
Microrganismos contaminantes	1	17	1	30
Ausência de microrganismos	1	27	1	34
TOTAL	91	-	90	-

^a Não foram incluídas as culturas cujos resultados foram negativos para micobactérias.

^b Não foram incluídas 02 culturas mistas de BAAR com microrganismos contaminantes em que não foi possível a identificação fenotípica.



^a Uma cultura com resultado positivo pela PCR IS6110 foi identificada como NTM através dos métodos fenotípicos.

^b Culturas identificadas como outros microrganismos.

Gráfico 1 - Resultados de baciloscopia dos escarros submetidos à cultura de micobactérias no sistema BACTEC 460 TB.

No Gráfico 1 podem ser observados os resultados de baciloscopia das 107 amostras de escarro que foram submetidas ao exame de cultura de micobactérias pelo sistema BACTEC 460. Das 61 amostras de escarro consideradas para o segundo parâmetro de avaliação, ou seja, com baciloscopia negativa, a técnica da PCR IS6110 detectou e amplificou o DNA do bacilo em 45 culturas, das quais 44 foram identificadas como *M. tuberculosis* pelos métodos fenotípicos. Considerando-se os resultados de amplificação obtidos a partir das amostras paucibacilares, a técnica apresentou sensibilidade e especificidade relativamente elevadas (100% e 94,1%, respectivamente). Nestes casos, a identificação por intermédio da técnica molecular ocorreu, em média, 5,5 dias antes do que a identificação pelo método fenotípico. Em relação às 46 culturas cujos espécimes clínicos apresentaram baciloscopia positiva, todas foram identificadas como *M. tuberculosis* através dos métodos fenotípicos e molecular (sensibilidade e especificidade iguais a 100%).

V. Discussão

5 DISCUSSÃO

O ressurgimento da tuberculose nos países desenvolvidos e o aumento mundial no número de casos novos, associado à epidemia da SIDA (CORBETT *et al.*, 2003), reafirmaram a necessidade da adoção de medidas visando o combate à doença. O diagnóstico laboratorial precoce é essencial para o controle da tuberculose, visto que possibilita a instituição de terapia adequada, resultando na diminuição da infecciosidade do doente, além de permitir a adoção de medidas profiláticas para o combate à transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* (WHO, 2006; PASCOPELLA *et al.*, 2004; DROBNIIEWSKI *et al.*, 2003; TENOVER *et al.*, 1993).

Nos Estados Unidos, o CDC recomenda que o tempo total entre a chegada do espécime clínico no laboratório e a identificação do bacilo seja de, no máximo, 21 dias (CDC, 2005). Apesar de ser o padrão para a confirmação diagnóstica da tuberculose, a cultura requer entre 4 e 8 semanas para um diagnóstico definitivo. A necessidade de um teste para o diagnóstico laboratorial rápido da doença impulsionou o desenvolvimento de novas metodologias, incluindo as técnicas moleculares para detecção e identificação do *M. tuberculosis* (WOODS, 2002; HALE *et al.*, 2001; SCHLUGER, 2001; CDC, 1999). A reação em cadeia da polimerase é capaz de detectar até uma cópia de DNA de *M. tuberculosis* (EISENACH *et al.*, 1990) e, por utilizar seqüências oligonucleotídicas que são específicas para o patógeno, é uma técnica que apresenta alta especificidade. Além destas características, a PCR é capaz de definir, em poucas horas, sobre a presença ou não do patógeno na amostra, o que justificaria seu amplo emprego no diagnóstico das micobacterioses (SOMOSKOVI *et al.*, 2003; MONTORO *et al.*, 1998; IEVEN & GOOSSENS, 1997).

Na expectativa de se obter um diagnóstico rápido de tuberculose, a tecnologia da amplificação de ácidos nucleicos foi empregada no desenvolvimento de métodos comerciais e não comerciais (PCR *in house*), visando a detecção de *M. tuberculosis* diretamente de espécimes clínicos. Entretanto, diversos estudos demonstraram uma grande variabilidade no desempenho dessas técnicas, não permitindo a utilização exclusiva desses métodos para o diagnóstico de tuberculose pulmonar (FLORES *et*

al., 2005; GOESSENS *et al.*, 2005; BOGARD, 2001; KAUL, 2001; NOORDHOEK *et al.*, 1996; SCHIRM *et al.*, 1995; NOORDHOEK *et al.*, 1994).

A amplificação do DNA a partir do cultivo do bacilo apresenta melhores resultados quando comparada à PCR realizada diretamente a partir de amostras clínicas. A utilização de métodos moleculares comerciais diretamente em cultivos de *M. tuberculosis* em meios BACTEC 12B tem apresentado boa especificidade (98% a 100%) e sensibilidade (93% a 100%) (DESMOND & LORETZ, 2001; PIERSIMONI *et al.*, 2001; BERGMANN & WOODS, 1999; NINET *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1997). No entanto, apesar dos resultados obtidos, esses métodos têm como grande desvantagem seu alto custo, o que torna inviável sua utilização rotineira em países em desenvolvimento (DOWDY *et al.*, 2003).

No presente estudo, propusemo-nos a avaliar o desempenho de uma técnica de PCR na detecção de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* em culturas de meios BACTEC 12B com índice de crescimento igual ou maior a 30. Apesar do uso do sistema semi-automatizado BACTEC 460 TB[®] estar sendo gradualmente descontinuado e substituído por métodos não radiométricos, optamos por empregar o meio líquido BACTEC 12B devido à utilização rotineira deste sistema no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infeciosas da UFES, desde 1992. Acreditamos que a técnica aqui avaliada possa ser utilizada em culturas de meio BBL MGIT[™], cuja incubação e leitura são feitas através do sistema não radiométrico BACTEC-MGIT 960[®] (Becton Dickinson Microbiology Systems), em decorrência da semelhança entre os dois meios de cultura.

Para o estudo proposto, julgamos necessária uma avaliação prévia da especificidade dos *primers* utilizados, cujo alvo de amplificação é a seqüência de inserção IS6110. Como está presente no genoma do *M. tuberculosis* em múltiplas cópias (THIERRY *et al.*, 1990a), técnicas de PCR baseadas na amplificação desta região têm apresentado melhor sensibilidade, quando comparadas à utilização de outras seqüências alvo (FLORES *et al.*, 2005).

A existência de cepas de *M. tuberculosis* cujo genoma não possui IS6110 tem sido raramente observada. Um estudo realizado por YUEN *et al.* (1993) demonstrou a

ausência da seqüência em quatro (9,8%) de 41 cepas de *M. tuberculosis* provenientes do Vietnan. Através da técnica de *fingerprinting*, VAN SOOLINGEN *et al.* (1993) analisaram 63 cepas de *M. tuberculosis* procedentes da Índia, detectando a ausência de IS6110 em uma (1,6%) delas. Utilizando a mesma técnica de genotipagem, AGASINO *et al.* (1998) analisaram todos os casos de tuberculose notificados em São Francisco, EUA, entre janeiro de 1991 e dezembro de 1996. Das 1390 cepas analisadas, apenas quatro (0,28%) não apresentaram a seqüência IS6110. Os autores inferem que essas cepas localizam-se em determinadas áreas geográficas, como o Sudeste Asiático. No Brasil, OGUSKU & SALEM (2004) detectaram a presença da IS6110 em 81 espécimes clínicos provenientes de pacientes do estado do Amazonas, ratificando a utilização desta seqüência para a identificação de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis*. Atualmente, muitas técnicas de identificação e genotipagem do *M. tuberculosis* empregam esta seqüência como região alvo da amplificação (SAVELKOUL *et al.*, 2005; TANAKA *et al.*, 2000; VAN EMBDEN *et al.*, 1993; THIERRY *et al.*, 1990b). Em nosso estudo, optamos por utilizar um par de primers (IS6B e IS7B) que amplifica um fragmento de 123pb da seqüência IS6110.

A especificidade dos *primers* utilizados foi confirmada a partir dos resultados obtidos durante a avaliação prévia da técnica de PCR IS6110. A amplificação do fragmento de 123pb da seqüência IS6110 ocorreu exclusivamente no DNA extraído das micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. africanum* e *M. bovis*). Apesar desta seqüência não permitir a distinção entre as espécies do Complexo *M. tuberculosis*, em regiões com alta prevalência de tuberculose, como no Brasil, a especificidade da IS6110 para *M. tuberculosis* é alta, visto que esta espécie é a responsável pela maioria dos casos da doença nestas regiões (COUSINS *et al.*, 2003). O fato de haver apenas uma cópia da IS6110 no genoma do *M. bovis* (THIERRY *et al.*, 1990a) não influenciou o resultado da amplificação, cujas bandas, visualizadas no gel de poliacrilamida a 4%, foram uniformes nas três espécies analisadas. Nossos resultados confirmaram a especificidade desta seqüência para a detecção de *M. tuberculosis*, conforme dados encontrados em vários estudos apresentados na literatura (SCHIRM *et al.*, 1995; CLARRIDGE *et al.*, 1993).

A seqüência IS6110 possui homologia com seqüências relacionadas à família IS3 (THIERRY *et al.*, 1990a), que está presente em diversas bactérias, incluindo membros da família *Enterobacteriaceae* (MAHILLON & CHANDLER, 1998) e em algumas micobactérias não causadoras de tuberculose (NTM). A ocorrência de reação cruzada entre essas seqüências foi demonstrada por alguns autores. Utilizando uma técnica de *nested* PCR específica para uma região da seqüência IS6110, KENT *et al.* (1995) obtiveram resultados falso-positivos com NTM. A utilização dessa seqüência para o estudo de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* foi, então, questionada pelos autores. Visando confirmar os resultados de KENT *et al.*, HELLYER *et al.* (1996) avaliaram três métodos de amplificação baseados na seqüência IS6110 e não encontraram nenhuma reação cruzada em 27 micobactérias não causadoras de tuberculose testadas, incluindo 26 NTM utilizadas no estudo de KENT *et al.* Os autores sugerem que a homologia com outras espécies esteja restrita à região central da IS6110, cuja amplificação origina um fragmento de 181pb. KENT *et al.* utilizaram *primers* específicos para esta região e HELLYER *et al.* concluíram que a região da IS6110 a ser amplificada influencia a especificidade da reação, devendo ser criteriosamente selecionada. HELLYER *et al.* (1998) recomendam a inclusão do DNA de *M. tuberculosis*, como controle positivo, e do DNA de microrganismos não relacionados, que possuam seqüências homólogas à IS3, como controle negativo, com o objetivo de monitorar a ocorrência de reações cruzadas.

Em conformidade com HELLYER *et al.* (1998), escolhemos a *Escherichia coli* como controle negativo, em virtude da ampla distribuição de IS3 nesta enterobactéria (MAHILLON & CHANDLER, 1998). Em nosso estudo, nenhuma reação de amplificação apresentou reação cruzada com esta bactéria, confirmando a especificidade dos *primers* utilizados, visto que não ocorreu homologia da IS3 com o fragmento de 123pb da IS6110.

De acordo com WILSON (1997), alguns fatores podem resultar em inibição da PCR, como a presença de debris celulares e de DNA não alvo da amplificação na amostra analisada. Para avaliar a possibilidade de ocorrer inibição da PCR IS6110 nas condições descritas acima, submetemos culturas mistas de H37Ra com bactérias não *M. tuberculosis* à reação de amplificação. Dentre as culturas testadas,

destacamos o cultivo de *E. coli* / H37Ra. Esta cultura apresentou índice de crescimento de 451, que, de acordo com SIDDIQI (1989), corresponde aproximadamente a 1×10^6 CFU/mL. Apesar de não podermos precisar a quantidade proporcional de cada bactéria presente nesta cultura mista, supomos que, em virtude do lento crescimento do *M. tuberculosis*, a quantidade de DNA de *E. coli* seja superior à de DNA de H37Ra. Não obstante este fato, houve amplificação do DNA de *M. tuberculosis* presente nesta e em todas as culturas mistas, confirmando o bom desempenho da técnica testada.

Diante dos resultados obtidos na avaliação da especificidade dos *primers*, prosseguimos o estudo avaliando a capacidade da PCR IS6110 em detectar *M. tuberculosis* em meios de cultura BACTEC 12B. Para este objetivo, utilizamos culturas de *M. tuberculosis* H37Ra em 12B apresentando diversos índices de crescimento, sendo que todas apresentaram reação de amplificação positiva. A PCR IS6110 foi capaz de detectar o DNA de *M. tuberculosis* em culturas que apresentaram índices de crescimento entre 41 e 552, que, de acordo com SIDDIQI (1989), correspondem, aproximadamente, a concentrações bacterianas de 1×10^3 CFU/mL e 1×10^6 CFU/mL, respectivamente. Este fato demonstra a eficácia desta técnica em detectar pequenas quantidades do bacilo no meio BACTEC 12B e, ainda, que o excesso de ácidos nucléicos não acarretou inibição da PCR.

A amplificação do DNA presente nos sobrenadantes das culturas de H37Ra certificou a capacidade de detecção da técnica, sugerindo que a extração do DNA dos meios 12B possa prescindir da etapa de centrifugação.

Os resultados obtidos na avaliação prévia da PCR IS6110 validaram sua utilização na amplificação de *M. tuberculosis* provenientes de culturas de escarro em meios 12B. Em nosso estudo, optamos por amplificar culturas em meios 12B que apresentaram IC igual ou maior a 30, visto que o sistema BACTEC 460 TB[®] utilizado no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES está programado para apresentar resultados positivos a partir deste valor de IC. Alguns autores realizaram a PCR em meios 12B cujos índices de crescimento foram inferiores (DESMOND & LORETZ, 2001; SMITH *et al.*, 1997; RYANG *et al.*, 1996; FORBES & HICKS, 1994; MORRIS, 1994). No entanto, a principal vantagem

encontrada na utilização este procedimento é a diminuição dos resultados de crescimento falso positivos.

Em nosso trabalho, um total de 107 culturas de escarro provenientes de 98 pacientes com suspeita clínica e/ou radiológica de tuberculose foi analisado, sendo que todos os 107 meios 12B apresentaram crescimento microbiano. A técnica da PCR IS6110 foi positiva em todas as 90 culturas identificadas como *M. tuberculosis* pelos métodos fenotípicos. Os resultados de PCR obtidos demonstraram sensibilidade de 100%, especificidade de 93,3% e concordância de 99,05%.

Em conformidade com nossos resultados, semelhante sensibilidade foi encontrada em alguns estudos que utilizaram os métodos moleculares comerciais em cultivos de *M. tuberculosis* (SOMOSKOVI *et al.*, 2003; DESMOND & LORETZ, 2001; PIERSIMONI *et al.*, 2001; BADAQ *et al.*, 1999; BERGMAN & WOODS, 1999; NINET *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1997). Já com relação à utilização de técnicas de PCR *in house* a partir de culturas de meios 12B, os quatro estudos encontrados na literatura pesquisada apresentaram sensibilidades comparáveis à obtida em nosso trabalho. O estudo pioneiro foi realizado por CORMICAN *et al.* (1992), que amplificaram corretamente 15 de 15 culturas de *M. tuberculosis* em meio 12B. Em 1994, FORBES & HICKS testaram culturas de diferentes micobactérias em meio 12B e utilizaram dois pares de *primers*, sendo um deles baseado na seqüência de inserção IS6110. A técnica de PCR foi 100% sensível e 99,7% específica. Em um estudo retrospectivo, MORRIS *et al.* (1994) obteve 100% de sensibilidade e especificidade. Utilizando um número maior de amostras, RYANG *et al.* (1996) analisou 262 culturas de meios 12B, obtendo uma sensibilidade de 99,5% e uma especificidade de 100%.

Dentre as 107 culturas analisadas em nosso estudo, oito foram identificadas fenotipicamente como outras micobactérias que não *M. tuberculosis*. Dentre essas, em uma houve a amplificação do fragmento de 123pb através da PCR IS6110, representando uma perda de 6,7% de especificidade. Alguns estudos apresentaram menor especificidade. No Brasil, ao avaliar uma técnica de PCR *in house*, BOLLELA *et al.* (1999a) obtiveram uma especificidade de 81%. Já na avaliação final dos trabalhos analisados por SUFFYS *et al.* (2000), a especificidade foi de apenas 71,6%.

O método utilizado em nosso estudo é descrito como altamente sensível (WOLK *et al.*, 2001; IEVEN & GOOSSENS, 1997; PERSING, 1991) e, se considerarmos este fato, a chance do aparecimento de resultados falso-positivos é proporcionalmente maior. Em nossa pesquisa, as estratégias recomendadas para o controle de falso-positivos foram rigorosamente seguidas, dentre elas a separação física das áreas de preparo da amostra, dos reagentes da reação e dos procedimentos pós-amplificação; utilização de cabines de segurança biológica, luvas, materiais descartáveis e aplicação de boas práticas laboratoriais (WOLK *et al.*, 2001; TANG & PERSING, 1999). Este fato, aliado ao critério utilizado para identificação de cepa de *M. tuberculosis*, baseado somente nos métodos fenotípicos, nos faz questionar se esse resultado tenha ocorrido devido a uma contaminação laboratorial e/ou a uma inespecificidade do *primer*.

Quando o desempenho de um novo método diagnóstico é avaliado, o rendimento do teste diagnóstico usado como padrão ouro é um parâmetro crítico. A cultura convencional, como o cultivo em meio de Löwenstein-Jensen ou BACTEC 12B, é considerada o padrão ouro para a detecção de *M. tuberculosis*. O método BACTEC tem apresentado sensibilidade e especificidade acima de 90% (CASAL *et al.*, 1997; STAGER *et al.*, 1991; ROBERTS *et al.*, 1983). No entanto, quando procedimentos de amplificação de ácidos nucleicos são utilizados, o diagnóstico clínico deve também ser considerado. A cultura identificada como NTM que apresentou o resultado de PCR positivo foi proveniente de um paciente em tratamento contra tuberculose há dois meses, em decorrência de diagnóstico confirmado da doença. Na época do diagnóstico, uma das amostras de escarro deste paciente, submetida ao exame microbiológico, foi incluída no nosso estudo e apresentou resultado positivo através da PCR IS6110. Assim, é possível que o resultado de PCR falso-positivo seja proveniente de uma cultura mista de NTM e *M. tuberculosis*, cuja quantidade não tenha sido detectada através do cultivo, devido à sua menor sensibilidade. Neste caso, o resultado positivo de amplificação estaria correto. Infelizmente, em decorrência de uma falha no processo de armazenamento do DNA extraído desta cultura, não foi possível confirmar esse resultado de PCR.

Uma outra explicação para o fato é a presença de bacilos inviáveis na amostra do paciente. Esta situação é comum, visto que a PCR é capaz de detectar o material genético de microrganismos mortos, comumente presentes em pacientes sob tratamento quimioterápico. Na literatura, são encontrados vários estudos que relatam a persistência de positividade da PCR durante e após o tratamento quimioterápico (YUEN, 1993). Em 2001, KAUL observou resultados de PCR positivos em amostras de pacientes dois anos após terminada a terapia (dados não publicados). Em um estudo conduzido por RAJALAHTI *et al.* (2001), o tempo de conversão do resultado positivo de PCR após o início de tratamento foi, em média, de 110 dias. Assim sendo, a utilização da PCR para monitoramento do tratamento de pacientes com tuberculose não é recomendada. Inicialmente, este fato não foi considerado no planejamento de nosso estudo, que incluiu amostras de escarro provenientes de pacientes não diagnosticados e de pacientes previamente diagnosticados em tratamento. De acordo com nossos resultados, a utilização da técnica de PCR IS6110 em amostras provenientes de pacientes submetidos à terapia contra tuberculose não é aconselhável. Além deste fato, os resultados de PCR devem ser interpretados juntamente com os dados clínicos do paciente, como demonstrado por LIM *et al.* (2003). No estudo de QUEROL *et al.* (1995), a especificidade da PCR *in house* em relação ao diagnóstico clínico inicial de tuberculose foi de 100%, sendo que, ao se considerar somente a cultura como diagnóstico de tuberculose, a especificidade foi de 90,5%.

A capacidade de um teste diagnóstico em detectar rapidamente o *M. tuberculosis* em amostras com baciloscopia negativa, a partir de pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, é de relevância evidente. Um estudo retrospectivo realizado por CONATY *et al.* (2005) encontrou forte relação entre o resultado de amplificação positivo em amostras paucibacilares e o valor diagnóstico do teste. Segundo SCHLUGER (1996), o desenvolvimento de técnicas de PCR sensíveis e específicas para o diagnóstico da forma paucibacilar de tuberculose pulmonar terá grande impacto na prática clínica, ao possibilitar a instituição precoce de terapia adequada, além de reduzir a necessidade de técnicas invasivas para o diagnóstico dessa forma da doença. Entretanto, muitos estudos demonstram que os métodos atuais de diagnóstico apresentam baixa sensibilidade (de 50% a 71%) em amostras com baciloscopia negativa (SARMIENTO *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a alta

sensibilidade da PCR IS6110 foi especialmente relevante para as 44 culturas de *M. tuberculosis* cujas amostras apresentaram baciloscopia negativa, sendo que todas as 44 (100%) foram identificadas pela técnica de PCR.

Na expectativa de se obter uma rápida identificação de micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*, o desempenho dos métodos moleculares em culturas positivas de meios 12B tem sido avaliado através de vários estudos. Dentre os métodos comerciais, a tecnologia das sondas genéticas é a mais utilizada, apresentando sensibilidades entre 83,0% e 100% (DESMOND & LORETZ, 2001; PIERSIMONI *et al.*, 2001; BERGMANN & WOODS, 1999; PETERSON *et al.*, 1989). Com o mesmo objetivo, o teste AMPLICOR[®] MTB também tem sido avaliado, obtendo sensibilidades entre 92,0% e 100%, e especificidades entre 97,6% e 100% (NINET *et al.*, 1999; HERNANDEZ *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1997).

Apesar dos bons resultados apresentados, os métodos moleculares comerciais possuem algumas desvantagens, além de serem relativamente caros. No caso das sondas genéticas, alguns estudos demonstraram que podem ocorrer reações cruzadas entre a sonda utilizada para identificação do bacilo e o DNA de micobactérias não pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*, como o *M. cellatum* (BUTLER *et al.*, 1994), *M. avium* e *M. terrae* (LIM *et al.*, 1991). Somando-se a este fato, a utilização deste método ainda requer uma quantidade mínima de 10⁵ bacilos puros em cultura (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). Em seus trabalhos, DESMOND & LORETZ (2001) e BERGMANN & WOODS (1999) descreveram que os métodos moleculares foram aplicados em meios 12B com índices de crescimento iguais ou maiores a 10 e 50, respectivamente. No entanto, os autores não especificaram os índices de crescimento dos cultivos que apresentaram identificação molecular positiva. Em 1990, BODY *et al.* demonstraram que a sensibilidade do método de sondas genéticas aplicado em cultivos de meios 12B, com índices de crescimento entre 400 e 999, foi de 70%. Uma redução significativa da sensibilidade ocorreu quando os índices de crescimento foram menores a 400, e o método detectou apenas 33% das culturas de *M. tuberculosis*. Segundo recomendações do fabricante, para o teste AccuProbe[®] ser realizado a partir do meio 12B, este deve apresentar turbidez equivalente ou maior que o padrão número um da escala de

McFarland (BADAK *et al.*, 1999), o que corresponde a uma quantidade mínima de 3×10^8 UFC / mL (BOLLELA *et al.*, 1999b).

Em nosso trabalho, o índice de crescimento foi menor do que 50 em 30,76% (28 de 91) das culturas com resultado de PCR positivo. A técnica de PCR IS6110 foi capaz de detectar e amplificar o DNA em cultivos contendo, aproximadamente, 1×10^3 UFC/mL (SIDIQI,1989), o que ratifica a excelente sensibilidade desta técnica. FORBES & HICKS (1994) obtiveram resultado semelhante através de uma técnica de PCR *in house*. Como pretendíamos avaliar o desempenho da PCR IS6110 a partir de diversos índices de crescimento dos meios 12B, o intervalo dos ICs submetido à amplificação foi amplo. O maior IC testado foi 583. Acreditamos que a porcentagem citada acima seria maior, caso a seleção dos meios 12B submetidos à amplificação contemplasse maior número de cultivos com $IC \leq 50$.

Devido à praticidade e visando otimizar custos, a frequência com que as reações de amplificação de nosso estudo foram realizadas foi determinada pela demanda dos cultivos selecionados. Portanto, nem todas as amostras foram submetidas à PCR no mesmo dia em que suas alíquotas foram retiradas dos meios 12B. No entanto, para avaliarmos a diferença entre o tempo de identificação através dos métodos fenotípicos e molecular, consideramos que a PCR foi realizada no mesmo dia da seleção da amostra, visto que o tempo total entre a extração do DNA e o resultado final da PCR é de aproximadamente um dia. Assim sendo, a utilização da PCR IS6110 resultou em um tempo médio de detecção e identificação de 16,4 dias, a partir do processamento e inoculação do espécime clínico, comparados aos 26,1 dias necessários para a identificação fenotípica do bacilo através do NAP, com uma diferença significativa de 9,7 dias entre os dois métodos. Tempo de identificação semelhante foi encontrado por BERGMANN & WOODS (1999) e SMITH *et al.* (1997). A identificação molecular de *M. tuberculosis* nas 44 culturas, cuja baciloscopia do escarro foi negativa, ocorreu, em média, 5,5 dias mais rápido que a identificação fenotípica. Se analisarmos somente os 87 meios 12B cuja microscopia evidenciou presença exclusiva de BAAR, o tempo médio de identificação é reduzido para 11,6 dias, cerca de quatro dias mais rápido quando comparado à identificação pelo NAP.

No estudo de FORBES & HICKS (1994), a incorporação da PCR na rotina laboratorial resultou em uma significativa redução de 15 dias no tempo de identificação do bacilo.

Do total de 107 culturas de meios 12B analisadas em nosso estudo, sete (8,4%) apresentaram crescimento exclusivo de outros microrganismos que não micobactérias. Os índices de crescimento apresentados por estes cultivos variaram entre 30 e 167. A PCR IS6110 foi negativa em todos os 7 cultivos em meios 12B. Este fato demonstra, mais uma vez, que os *primers* IS6B e IS7B são específicos para a amplificação da região IS6110 e, ainda, que não ocorreu reação cruzada com o DNA dos microrganismos presentes nestes cultivos.

Ressaltamos ainda que de todos os 107 meios 12B analisados, cinco culturas (4,67%) apresentaram crescimento concomitante de BAAR com microrganismos contaminantes. A relevância da utilização da PCR IS6110 na redução do tempo de identificação do bacilo foi demonstrada, sobretudo, nestes cultivos, visto que a técnica foi eficaz na detecção direta do *M. tuberculosis* em três destas culturas mistas. A identificação pelo método molecular foi, em média, 14 dias mais rápida, quando comparada à identificação fenotípica, cuja realização foi possível somente após novos procedimentos de descontaminação e incubação. Utilizando um método de amplificação comercial em culturas de meios 12B contaminadas, ZHENG *et al.* (2001) reduziram o tempo de identificação do bacilo em 12 dias. No entanto, o teste apresentou uma reação falso-positiva com *M. cellatum*. Embora com objetivos diferentes, LIMA *et al.* (2005) demonstraram que a utilização de PCR possibilitou a identificação rápida de 96% das micobactérias presentes em culturas de escarro contaminadas no meio de Löwenstein-Jensen. Devemos enfatizar que em razão do reduzido número de culturas mistas ocorridas em nosso estudo e diante dos bons resultados obtidos, seria interessante a realização de outros estudos dirigidos especificamente a este propósito.

A contaminação microbiana presente em duas das cinco culturas mistas de nosso trabalho não permitiu a identificação fenotípica da espécie micobacteriana presente nestas amostras, apesar das mesmas terem sido submetidas a novo processo de descontaminação. A PCR de ambos os cultivos foi negativa e este resultado foi

confirmado através de nova amplificação. Estas culturas foram procedentes de pacientes com diagnóstico confirmado de tuberculose e sob terapia antimicobacteriana há cinco meses. Diante de todos os resultados obtidos em nosso estudo, supomos que a não amplificação dessas amostras represente a ausência de *M. tuberculosis* nas mesmas. Porém, de acordo com WILSON (1997), além da presença de substâncias inibidoras, outros fatores, como degradação do DNA, extração ineficaz e distribuição não homogênea do microrganismo na amostra, podem resultar em PCR negativa. Infelizmente, em decorrência de um erro de planejamento, a não inclusão de um controle interno da amplificação em nossas reações acarretou a impossibilidade de chegarmos a uma conclusão definitiva sobre a identificação molecular das duas culturas acima descritas, já que a ausência de amplificação nem sempre indica a inexistência do bacilo na amostra (ROSENSTRAUS *et al.*,1998). Apesar deste fato, acreditamos que os demais resultados negativos de PCR obtidos em nosso trabalho sejam fidedignos, sobretudo em decorrência da ótima sensibilidade apresentada pela PCR IS6110 e do alto grau de concordância entre os métodos de identificação.

Convém salientar ainda que dentre os três cultivos mistos que apresentaram resultado de PCR positivo, dois foram provenientes de amostras de escarro com baciloscopia negativa. Em uma destas culturas, o crescimento microbiano foi detectado apenas um dia após a inoculação da amostra clínica no meio 12B. A excelente sensibilidade da técnica foi efetivamente demonstrada através da identificação molecular do bacilo neste cultivo, cujo IC foi de 56, indicando que a presença do DNA de microrganismos contaminantes não interferiu na eficácia da amplificação.

Apesar de ser uma técnica promissora para um diagnóstico rápido de tuberculose (CLEEF *et al.*,2005) , em países em desenvolvimento, como o Brasil, a avaliação de técnicas de PCR para o diagnóstico da doença não tem sido priorizada, principalmente devido à ausência de informações acerca de sua pertinência clínica e/ou de sua relação de custo-efetividade.

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram a eficácia da PCR IS6110 na identificação rápida de *M. tuberculosis* em cultivos de meios 12B e evidenciam a

relevância da técnica no diagnóstico precoce da tuberculose pulmonar, sobretudo em pacientes paucibacilíferos. Acreditamos que os benefícios resultantes da utilização da PCR IS6110, associados à rapidez e à simplicidade do protocolo de amplificação, viabilizem a incorporação da mesma à rotina de laboratórios de microbiologia clínica, principalmente em locais onde o diagnóstico molecular de outras doenças infecciosas esteja estabelecido.

VI. Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com os nossos resultados, podemos concluir que:

1. Os *primers* IS6B e IS7B são específicos para a amplificação do fragmento de 123pb da seqüência de inserção IS6110;
2. Os métodos de identificação molecular e fenotípicos apresentam elevado grau de concordância;
3. A utilização da PCR IS6110 diminui significativamente o tempo de identificação do *M. tuberculosis* em culturas, quando comparado aos métodos fenotípicos;
4. O método de PCR IS6110 é eficiente na identificação direta do *M. tuberculosis* em meio BACTEC 12B, sobretudo em culturas que apresentem crescimento concomitante do bacilo com microrganismos contaminantes;
5. A PCR IS6110 constitui uma técnica importante na confirmação precoce do diagnóstico de tuberculose pulmonar, principalmente das formas paucibacilares da doença;
6. A PCR IS6110 pode ser particularmente útil na exclusão do Complexo *M. tuberculosis* em culturas cujas amostras de escarro sejam provenientes de pacientes infectados com outras espécies de micobactérias.

VII. Referências bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, C.; HIRANO, K.; WADA, M.; KAZUMI, Y.; TAKAHASHI, M.; FUKASAWA, Y.; MIYAGI, C.; GOTO, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct test. J Clin Microbiol, v. 31, p. 3270-3274, 1993.

ADLER, J.J.; ROSE, D.N. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. In Rom, W. N.; Garay, S. (Ed). Tuberculosis. Boston: Little, Brown & Co., 1996. p. 129-140.

AGASINO, C.B.; PONCE DE LEON, A.; JASMER, R.M.; SMALL, P.M. Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains in San Francisco that do not contain IS6110. Int J Tuberc Lung Dis, v. 2, p. 518 – 520, 1998.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med, v. 161, p.1376-1395, 2000.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; GALÁN, J.C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SÚAREZ, G.; DOMÍNGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Evol Microbiol, v. 49, p. 1263 – 1273, 1999.

ASSELINÉAU, J.; LEDERER, E. Structure of the mycolic acids of mycobacteria. Nature, v. 166, p. 782 – 783, 1950.

BA, F.; RIEDER, H.L. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli. Int J Tuberc Lung Dis, v. 3, p. 1101 – 1105, 1999.

BADAK, F.Z.; GOKSEL, S.; SERTOZ, R.; NAFILÉ, B.; ERMERTCAN, S.; CAVUSOGLU, C.; BILGIC, A. Use of nucleic acid probes for identification of

Mycobacterium tuberculosis directly from MB/BacT bottles. J Clin Microbiol, v. 37, p.1602 – 1605, 1999.

BERGMANN, J.S.; WOODS, G.L. Enhanced Amplified Mycobacterium Tuberculosis Directed Test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in positive BACTEC 12B broth cultures of respiratory specimens. J Clin Microbiol, v. 37, p. 2099 – 2111, 1999.

BÖDDINGHAUSS, B.; ROGALL, T.; THOMAS, F.; BLÖCKER, H.; BÖTTGER, E.C. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol, v. 28, p. 1751 – 1759, 1990.

BODY, B.A.; WARREN, N.G.; SPICER, A.; HENDERSON, D.; CHERY, M. Use of Gen-Probe and Bactec for rapid isolation and identification of mycobacteria. Correlation of probe results with growth index. Am J Clin Pathol, v. 93, p. 415 – 420, 1990.

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.B.; 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. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v. 20, p. 724 – 731, 2001.

BOLLELA, V.R.; SATO, D.N.; FONSECA, B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico de tuberculose pulmonar. Rev Saúde Pública, v. 33, p. 281 – 286, 1999a.

BOLLELA, V.R.; SATO, D.N.; FONSECA, B.A.L. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool. Braz J Med Biol Res, v. 32, p. 1073-1076, 1999b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 2ª ed. Rio de Janeiro, 1994. 115p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. **Controle da Tuberculose: Uma proposta de integração ensino-serviço**. 5ª. ed. Rio de Janeiro: 2002. 236p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. **II Consenso brasileiro de tuberculose – 2004**. J Bras Pneumol, v. 30, supl. 1, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Relatório de situação: Espírito Santo**. Brasília: 2005. 20 p.

BRISSÖN-NOEL, A.; GICQUEL, B.; LECOSSIER, D.; LÈVY-FRÉBAULT, V.; NASSIF, X.; HANCE, A.J. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet, v. 2, p. 1069 – 1071, 1989.

BUIJTELS, P.C.A.M.; PETIT, P.L.C. Comparison of NaOH-*N*-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. J Microbiol Methods, v. 62, p. 83 – 88, 2005.

BURDASH, N.M.; MANOS, J.P.; ROSS, D.; BANNISTER, E.R. Evaluation of the acid-fast smear. J Clin Microbiol, v. 4, p. 190 – 191, 1976.

BUTLER, W.R.; O'CONNOR, S.P.; YAKRUS, M.A.; GROSS, W.M. Cross-reactivity of genetic probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with newly described species *Mycobacterium celatum*. J Clin Microbiol, v. 32, p. 536 – 538, 1994.

BUX-GEWEHR, I.; HAGEN, H.P.; RÜSCH-GERDES, S.; FEURLE, G. Fatal pulmonary infection with *Mycobacterium celatum* in an apparently immunocompetent patient. J Clin Microbiol, v. 36, p. 587 – 588, 1998.

CASAL, M.; GUTIERREZ, J., VAQUERO, M. Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. Int J Tuberc Lung Dis, v. 1, p. 81 – 84, 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Tuberculosis elimination revisited: obstacles, opportunities, and a renewed commitment. M M W R, v. 48, p. 1 – 20, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National plan for reliable tuberculosis laboratory services using a systems approach. M M W R, v. 54, p. 1 – 16, 2005.

CLARRIDGE, J.E.; SHAWAR, R.M.; SHINNICK, T.M.; PLIKAYTIS, B.B. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol, v. 31, p.2049 – 2056, 1993.

CLEEFF, M.V.; KIVIHYA-NDUGGA, L.; GITHUI, W.; NG'ANG'A, L.; KIBUGA, D.; ODHIAMBO, J.; KLATSER, P. Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya. Int J Tuberc Lung Dis, v. 9, p. 877 – 883, 2005.

COHEN, R.A.; MUZAFFAR, S.; SCHWARTZ, D.; BASHIR, S.; LUKE, S.; McGARTLAND, L.P.; KAUL, K. Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assay on sputum collected within 24 hours of hospital admission. Am J Respir Crit Care Med, v. 157, p. 156 – 161, 1998.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. **Direct smears.** In: Collins, C. H.; Grange, J. M.; Yates, M. D. (Ed). Tuberculosis bacteriology: organization and practice. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997. p. 48-56.

CONATY, S.J.; CLAXTON, A.P.; ENOCH, D.A.; HAYWARD, A.C.; LIPMAN, M.C.I.; GILLESPIE, S.H. The interpretation of nucleic acid amplification tests for tuberculosis: do rapid tests change treatment decisions? *J Infect*, v. 50, p. 187-192, 2005.

CORBETT, E.L.; WATT, C.J.; WALKER, N.; MAHER, D.; WILLIAMS, B.G.; RAVIGLIONE, M.C.; DYE, C. The growing burden of tuberculosis. *Arch Intern Med*, v. 163, p. 1009 – 1021, 2003.

CORMICAN, M.G.; BARRY, T.; GANNON, F.; FLYNN, J. Use of polymerase chain reaction for early identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures. *J Clin Pathol*, v. 45, p. 601 – 604, 1992.

CORNFIELD, D.B.; BEAVIS, K.G.; GREENE, J.A.; BOJAK, M.; BONDI, J. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the mycobacteria growth indicator tube and BACTEC 460 culture systems. *J Clin Microbiol*, v. 35, p. 2068 – 2071, 1997.

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.M.; ZUMARRAGA; BERNADELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 53, p. 1305 – 1314, 2003.

CRUCIANI, M.; SCARPARO, C.; MALENA, M.; BOSCO, O.; SERPELLONI, G.; MENGOLI, C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 2321 – 2325, 2004.

DESMOND, E.P.; LORETZ, K. Use of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct test for early detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC 12B medium. *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 1993 – 1995, 2001.

DOWDY, D.W.; MATERS, A.; PARRISH, N.; BEYRER, C.; CORMAN, S.E. Cost-effectiveness analysis of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct test as used routinely on smear-positive respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 948 – 953, 2003.

DROBNIIEWSKI, F.A.; CAWS, M.; GIBSON, A.; YOUNG, D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, v. 3, p. 141 – 147, 2003.

DYE, C.; SHEELE, S.; DOLIN, P.; PATHANIA, V.; RAVIGLIONE, M.C. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA*, v. 282, p. 677 – 686, 1999.

DYE, C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*, v. 367, p. 938-940, 2006.

EISENACH, K.D.; CRAWFORD, J.T.; BATES, J.H. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, v. 26, p. 2240 – 2245, 1988.

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 Infect Dis*, v. 161, p. 977 -981, 1990.

EISENACH, K.D.; SIFFORD, M.D.; CAVE, M.D.; BATES, J.H.; CRAWFORD, J.T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis*, v. 144, p. 1160 – 1163, 1991.

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

FORBES, B.A.; HICKS, K.E. Ability of PCR assay to identify *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC 12B vials. *J Clin Microbiol*, v. 32, p. 1725 – 1728, 1994.

FORBES, B.A.; HICKS, K.E. Substances interfering with direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by PCR: effects of bovine serum albumin. J Clin Microbiol, v. 34, p. 2125 – 2128, 1996.

GARAY, S.M. **Pulmonary tuberculosis**. In Rom, W.N.; Garay, S. (Ed). Tuberculosis. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 345 - 394.

GARG, S.K.; TIWARI, R.P.; TIWARI, D.; SINGH, R.; MALHOTRA, D.; RAMNANI, V.K.; PRASAD, G.B.K.S.; CHANDRA, R.; FRAZIANO, M.; COLIZZI, V.; BISEN, P.S. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations, and possibilities. J Clin Lab Anal, v. 17, p. 155 – 163, 2003.

GIAMPAGLIA, C.M.S.; MARTINS, M.C.; INUMARU, V.T.G.; BUTUEM, I.V.; TELLES, M.A.S. Evaluation of a rapid differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with p-nitrobenzoic acid and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. Int J Tuberc Lung Dis, v. 9, p. 206 – 209, 2005.

GOESSENS, W.H.F.; MAN, P.; KOELEMAN, J.G.M.; LUIJENDIJK, A.; TE WITT, R.; ENDTZ, H.P.; VAN BELKUM, A. Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbe Tec ET assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. J Clin Microbiol, v. 43, p. 2563 – 2566, 2005.

HAAS, D.W.; DES PREZ, R.M. ***Mycobacterium tuberculosis***. In: Mandell, G.L.; Douglas, R.G., Bennett, J.E. (Ed). Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1990. p. 2213 – 2243.

HALE, Y.M.; PFYFFER, G.E.; SALFINGER, M. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. Clin Infect Dis, v. 33, p. 834 -846, 2001.

HANNA, B.A. **Laboratory diagnosis**. In Rom, W.N.; Garay, S.M. (Ed). Tuberculosis. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 163 – 181.

HARRIES, A.D.; HARGREAVES, N.J.; KEMP, J.; JINDANI, A.; ENARSON, D. A.; MAHER, D.; SALANIPONI, F.M. Deaths from tuberculosis in sub-Saharan African countries with a high prevalence of HIV-1. *Lancet*, v. 357, p. 1519 – 1523, 2001.

HELLYER, T.J.; DesJARDIN, L.E.; ASSAF, M.K.; BATES, J.H.; CAVE, M.D.; EISENACH, K.D. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Clin Microbiol*, v. 34, p. 2843 – 2846, 1996.

HELLYER, T.J.; DesJARDIN, L.E.; BEGGS, M.L.; YANG, Z.; EISENACH, K.D.; CAVE, M.D.; BATES, J.H.; ASSAF, M.K.; CRAWFORD, J.T. IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. *J Clin Microbiol*, v. 36, p. 853 – 854, 1998.

HERNANDEZ, A.; BERGMANN, J.S.; WOODS, G.L. Amplicor MTB polymerase chain reaction test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive Difco ESP II brogh cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 27, p. 17 – 20, 1997.

HOBBY, G.L.; HOLMAN, A.P.; ISEMAN, M.D.; JONES, J. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 4, p. 94 – 104, 1973.

IEVEN, M.; GOOSSENS, H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev*, v. 10, p. 242 – 256, 1997.

KAUFMANN, S.H.E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Rev*, v. 1, p. 20 – 30, 2001.

KAUL, K.L. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*: impact on patient care. *Clin Chem*, v. 47, p. 1553 – 1558, 2001.

KENT, L.; McHUGH, L.K.; BILLINGTON, O.; DALE, J.W.; GILLESPIE, S.H. Demonstration of homology between of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. *J Clin Microbiol*, v. 33, p. 2290 – 2293, 1995.

KENT, P.T.; KUBICA, G.P. **Public health mycobacteriology – a guide for level III laboratory**. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985. (publication nº PB 86-216546)

LASZLO, A.; SIDDIQI, S.H. Evaluation of a rapid radiometric differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by selective inhibition with *p*-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropiophenone. *J Clin Microbiol*, v. 19, p. 694 – 698, 1984.

LEDERER, E.; ADAM, A.; CIORBARU, R.; PETIT, J.F.; WIETZERBIN-FALSZPAN, J. Cell-walls of mycobacteria and related organisms chemistry and immunostimulant properties. *Mol Cell Biochem*, v. 7, p. 87 – 104, 1975.

LEE, J-J.; SUO, J.; LIN, C-B.; WANG, J-D.; LIN, T-Y., TSAI, Y-C. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 7, p. 569 – 574, 2003.

LEITRITZ, L.; SCHUBERT, S.; BÜCHERL, B.; MASCH, A.; HEESEMAN, J.; ROGGENKAMP, A. Evaluation of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens of a university hospital with low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 3764 – 3767, 2001.

LIM, S.D.; TODD, J.; LOPEZ, J.; FORD, E.; JANDA, J.M. Genotypic identification of pathogenic *Mycobacterium* species by using a nonradioactive oligonucleotide probe. *J Clin Microbiol*, v. 29, p. 1276 – 1278, 1991.

LIM, T.K.; MUKHOPADHYAY, A.; GOUGH, A.; KHOO, K-L.; KHOO, S-M.; LEE, K-H.; KUMARASINGHE, G. Role of clinical judgment in the application of a nucleic acid amplification test for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest*, v. 124, p. 902 – 908, 2003.

LIMA, D.M.; BOLLELA, V.R.; JÁCOMO, B.J.T.; MARTINEZ, R.; FONSECA, B.A.L. Identification of mycobacterium species in contaminated cultures by polymerase chain reaction. *Chest*, v. 127, p. 1283 – 1288, 2005.

LIPSKY, B.A.; GATES, J.; TENOVER, F.C.; PLORDE, J.J. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. *Rev Infect Dis*, v. 6, p. 214-222, 1984.

LIU, P.I.; MCGREGOR, D.H.; FAUCHER, I.; JINKS, W.L.; MILLER, L.A.; GREEN, L.; LIU, J.G. Comparison of three culture media for isolation of *Mycobacterium tuberculosis*: a 6-year study. *Applied Microbiol*, v. 26, p. 880 – 883, 1973.

LOUDON, R.G.; ROBERTS, R.M. Singing and the dissemination of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, v. 98, p. 297 – 300, 1968.

LOUDON, R.G.; SPOHN, S.K. Cough frequency and infectivity in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, v. 99, p. 109 – 111, 1969.

MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 62, p. 725 – 774, 1998.

McGUINNESS, G.; RUBINOWITZ, A.N. **Imaging of thoracic tuberculosis infections.** In Rom, W.N.; Garay, S.M. (Ed). *Tuberculosis*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2004. p. 395 - 425.

METCHOCK, B.G.; NOLTE, F.S.; WALLACE Jr, R.J. ***Mycobacterium***. In Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. (Ed). *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press. 1999. p. 399 – 437.

MICHOS, A.G.; DAIKOS, G.L.; TZANETOU, K.; THEODORIDOU, M.; MOSCHOVI, M.; NICOLAIDOU, P.; PETRIKKOS, G.; SYRIOPOULOS, T.; KANAVAKI, S.; SYRIOPOULOU, V.P. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in respiratory and nonrespiratory specimens by the Amplicor[®] MTB PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 54, p. 121 – 126, 2006.

MILTGEN, J.; MORILLON, M.; KOECK, J.L.; VARNEROT, A.; BRIANT, J.F.; NGUYEN, G.; VERRROT, D.; BONNET, D.; VINCENT, V. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*. *Emerg Infect Dis*, v. 8, p. 1350 – 1352, 2002.

MONTORO, E.; VALDIVIA, J.; LEÃO, S.C. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Havana, Cuba, by IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and by the double-repetitive-element PCR method. J Clin Microbiol, v. 36, p. 3099 – 3102, 1998.

MORGAN, M.A.; HORSTMEIER, C.D.; DeYOUNG, D.R.; ROBERTS, G.D. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. J Clin Microbiol, v.18, p. 384 – 388, 1983.

MORRIS, A.; RELLER, L.; DEVLIN, B. Clinical usefulness of detecting growth of *Mycobacterium tuberculosis* in positive BACTEC phials using PCR. J Clin Pathol, v. 47, p. 190 – 191, 1994.

NINET, B.; ROHNER, P.; METRAL, C.; AUCKENTHALER, R. Assessment of use of the COBAS AMPLICOR system with BACTEC 12B cultures for rapid detection of frequently identified mycobacteria. J Clin Microbiol, v. 37, p. 782 – 784, 1999.

NOORDHOEK, G.T.; KOLK, A.H.J.; BJUNE, G.; CATTY, D.; DALE, J.W. ; FINE, P.E.M.; 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. J Clin Microbiol, v. 32, p. 277 – 284, 1994.

NOORDHOEK, G.T.; VAN 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. J Clin Microbiol, v. 34, p. 2522 – 2525, 1996.

OGUSKU, M.M.; SALEM, J.I. Análise de diferentes *primers* utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no estado do Amazonas. J Bras Pneumol, v. 30, p. 433 - 439, 2004.

PALACI, M.; UEKI, S.Y.M. ; SATO, D.N.; TELLES, M.A.S.; CURCIO, M.; SILVA, E.A.M. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for *Mycobacterium tuberculosis* recovery and drug susceptibility testing of isolates from respiratory specimens. J Clin Microbiol, v. 34, p. 762 – 764, 1996.

PALOMINO, J.C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. Eur Respir J, v. 26, p. 339 – 350, 2005.

PASCOPELLA, L; KELLAM, S.; RIDDERHORF, J.; CHIN, D.P.; REINGOLD, A.; DESMOND, E.; FLOOD, J.; ROYCE, S. Laboratory reporting of tuberculosis test results and patient treatment initiation in California. J Clin Microbiol, v. 42, p. 4209–4213, 2004.

PERSING, D.H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. J Clin Microbiol, v. 29, p. 1281 – 1285, 1991.

PETERSON, E.M.; LU, R.; FLOYD, C.; NAKASONE, A.; FRIEDLY, G.; LA MAZA, L.M. Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary cultures in BACTEC media using DNA probes. J Clin Microbiol, v.27, p.1543 – 1547,1989.

PETERSON, E.M.; NAKASONE, A.; PLATON-DeLEON, J.M.; JANG, Y.; DELAMAZA, L.M.; DESMOND, E. Comparison of direct and concentrate acid-fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium* spp. J Clin Microbiol, v. 37, p. 3564-3568, 1999.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C.; CALLEGARO, A.; TOSI, C.P.; NISTA, D.; BORNIGIA, S.; SCAGNELLI, M.; RIGON, A.; RUGGIERO, G.; GOGLIO, A. Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. J Clin Microbiol, v. 39, p. 651 – 657, 2001.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in clinical samples. J Clin Microbiol, v. 41, p. 5355 – 5365, 2003.

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. Chest, v. 107, p. 1631 – 1635, 1995.

RAJALAHTI, I.; VUORINEN, P.; LIIPPO, K.; NIEMINEN, M.M.; MIETTINEN, A. Evaluation of commercial DNA and rRNA amplification assays for assessment of treatment outcome in pulmonary tuberculosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v. 20, p. 746 – 750, 2001.

ROBERTS, G.D.; GOODMAN, N.L.; HEIFETS, L.; LARSH, H.W.; LINDNER, T.H.; McCLATCHY, J.K.; MCGINNIS, M.R.; SIDDIQI, S.H.; WRIGHT, P. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J Clin Microbiol, v. 18, p. 689 – 696, 1983.

ROSENSTRAUS, M.; WANG, Z.; CHANG, S-Y.; DeBONVILLE, D.; SPADORO, J.P. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. J Clin Microbiol, v. 36, p. 191 – 197, 1998.

RUFFINO-NETO, A. Programa de controle da tuberculose no Brasil: situação atual e novas perspectivas. Inf Epidemiol SUS, v.10, p. 129 – 138, 2001.

RUNYON, E.H. Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. Am J Clin Pathol, v. 54, p. 578 – 586, 1970.

RUSSELL, D.G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. Nature Rev, v. 2, p. 1 – 9, 2001.

RYANG, D.W.; RYANG, D.H.; SHIN, M.G.; SHIN, J.H.; KEE, S.J.; SUH, S.P. Alternative use of polymerase chain reaction instead of rho-nitro-alpha-acetylamino-

beta-hydroxypropiophenone test for the early detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC 12B cultures. APMIS, v. 104, p. 444 – 450, 1996.

SARMIENTO, O.L.; WEIGLE, K.A.; ALEXANDER, J.; WEBER, D.J. ; MILLER, W.C. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol, v. 41, p. 3233 – 3240, 2003.

SAVELKOUL, P.H.M.; CATSBURG, A.; MULDER, S.; OOSTENDORP, L.; SCHIRM, J.; WILKE, H.; VAN DER ZANDEN, A.G.M.; NOORDHOEK, G.T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with Real Time PCR: comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. J Microbiol Methods, v.66, p. 177-180, 2005.

SCHIRM, J.; OOSTENDORP, L.A.B.; MULDER, J.G. Comparison of Amplicor, in-house PCR, and conventional culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol, v. 33, p. 3221 – 3224, 1995.

SCHLUGER, N.W. **The polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis.** In Rom, W.N.; Garay, S. (Ed). Tuberculosis. Boston: Little, Brown & Co., 1996. p. 233 – 240.

SCHLUGER, N.W. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med, v. 164, p. 2020 – 2024, 2001.

SIDDIQI, S.H. BACTEC® TB System. Product and procedure manual. Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems. Maryland, USA. 1989.

SMITH, M.B.; BERGMANN, J.S.; WOODS, G.L. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC 12B broth cultures by the Roche Amplicor PCR assay. J Clin Microbiol, v. 35, p. 900 – 902, 1997.

SOINI, H.; VILJANEN, M.K. Gene amplification in the diagnosis of mycobacterial infections. APMIS, v.105, p. 345 – 353, 1997.

TENOVER, F.C. ; CRAWFORD, J.T.; HUEBNER, R.E.; GEITER, L.J.; HORSBURGH, C.R. Jr; GOOD, R.C. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol, v. 31, p. 767 – 770, 1993.

THIERRY, D.; CAVE, M.D.; EISENACH, K.D.; CRAWFORD, J.T.; BATES, J.H.; GICQUEL, B.; GUESDON, J.L. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Nucl Acids Res, v. 18, p.188, 1990a.

THIERRY, D.; BRISSON-NÖEL, A.; VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J-L.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol, v. 28, p. 2668 – 2673, 1990b.

THORPE, T.C.; WILSON, M.L.; TURNER, J.L.; DIGUISEPPI, J.; WILLERT, M.; MIRRETT, S.; RELLER, L.B. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. J Clin Microbiol, v. 28, p. 1608 – 1612, 1990.

TORTOLI, E.; PIERSIMONI, C.; BACOSI, D.; BARTOLONI, A.; BETTI, F.; BONO, L.; BURRINI, C.; SIO, G.; LACCHINI, C.; MANTELLA, A.; ORSI, P.G.; PENATI, V.; SIMONETTI, M.T.; BÖTTGER, E.C. Isolation of the newly described species *Mycobacterium celatum* from AIDS patients. J Clin Microbiol, v. 33, p. 137 – 140, 1995.

VAN EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T.; DALE, J.W.; EISENACH, K.D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICK, T.M.; SMALL, P.M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol, v. 31, p. 406 – 409 , 1993.

VAN SOOLINGEN, D.; HAAS, P.E.W.; HERMANS, P. W.M.; GROENEN, P.M.; VAN EMBDEN, J.D.A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, v. 31, p. 1987 – 1995, 1993.

VAN SOOLINGEN, D.; VAN DER ZANDEN, A.G.M.; HAAS, P.E.W.; NOORDHOEK, G.T.; KIERS, A.; FOUORAINE, N.A.; PORTAELS, F.; KOLK, A.H.J.; KREMER, K.; VAN EMBDEN, J.D.A. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. J Clin Microbiol, v. 36, p. 1840 – 1845, 1998.

YUEN, L.K.W.; ROSS, B.C.; JACKSON, K.M.; DWYER, B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. J Clin Microbiol, v. 31, p. 1615 – 1618, 1993.

WATTERSON, S.A.; DROBNIOWSKI, F.A. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. J Clin Pathol, v. 53, p. 727 – 732, 2000.

WAYNE, L.G.; DOUBEK, J.R. Diagnostic key to mycobacteria encountered in clinical laboratories. Applied Microbiology, v.16, p. 925 – 931, 1968.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. App Environ Microbiol, v. 63, p. 3741 – 3751, 1997.

WOLK, D.; MITCHELL, S.; PATEL, R. Principles of molecular microbiology testing methods. Inf Dis Clin North Am, v.15, p. 1157 – 1204, 2001.

WOODS, G.L. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. Infect Dis Clin North Am, v.16, p. 127 – 144, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Programme. Tuberculosis handbook. Geneve: Health Organization Publication: **WHO/TB/98.253**. 1998, 212p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The global plan to stop TB, 2006 -2015 Geneve: World Health Organization Publication: **WHO/HTM/STB/2006.35**. 2006, 172 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing. Geneve: World Health Organization Publication: **WHO/HTM/TB/2006.362**. 2006a, 250 p.

ZHENG, X.; PANG, M.; ENGLER, H.D.; TANAKA, S.; REPPUN, T. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in contaminated BACTEC 12B broth cultures by testing with amplified mycobacterium tuberculosis direct test. J Clin Microbiol, v. 39, p. 3718 – 3720, 2001.

