

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO DA PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE) NO CULTIVO PRECOCE DO
Mycobacterium tuberculosis
PARA UM RÁPIDO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA
TUBERCULOSE

Mariana Chagas

Florianópolis, 2008

Mariana Chagas

**ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO DA PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE) NO CULTIVO PRECOCE DO
Mycobacterium tuberculosis
PARA UM RÁPIDO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA
TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia – área de concentração Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Florianópolis, 2008

C433a Chagas, Mariana

Análise da contribuição da PCR (reação em cadeia da polimerase) no cultivo precoce do *Mycobacterium tuberculosis* para um rápido diagnóstico laboratorial da tuberculose / Mariana Chagas ; orientador Jairo Ivo dos Santos ; co-orientadora Maria Luiza Bazzo. – Florianópolis, 2008.
71f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2008.

Inclui bibliografia

1. Tuberculose – Diagnóstico. 2. *Micobacterium tuberculosis*.
3. Micobactérias. 4. Reação em cadeia de polimerase. 5. Cultura. I. Santos, Jairo Ivo dos. II. Bazzo, Maria Luiza. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

CDU: 615.12

Catálogo na fonte por: Onélia Silva Guimarães CRB-14/071

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo, com quem convivi por quase 8 anos e que considero minha mestre por excelência. Mostrou-me que para se tornar um profissional diferenciado e de qualidade é preciso trilhar um caminho contínuo e que nunca estamos prontos. O conhecimento se constrói aos poucos. Não foi só mestre no laboratório, mas também na vida. Muitas lições que vou levar por toda vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Aos meus pais, Carlos Chagas e Priscila Izabel Soares Chagas, e à minha irmã, Clarissa, por sempre me incentivarem a continuar estudando;

À Professora Dra. Maria Luiza Bazzo, por toda sua paciência e compreensão;

Ao Professor Dr. Jairo Ivo dos Santos, por ter aceitado a me orientar e por estar sempre disposto a ajudar;

À Professora Dra. Rosemeri Maurici da Silva, por sempre incentivar o estudo e a pesquisa;

À Professora Maria Cláudia, pela grande ajuda que me deu na etapa final deste trabalho;

Ao Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN/SC, sobretudo aos Servidores do Setor de Tuberculose, representados pela Farmacêutica Darcita Bürger Rovaris;

Ao Hospital Nereu Ramos, nas pessoas do Geraldo e do Lindomar, que me ajudaram na coleta de todas as amostras;

À Vera Lúcia, técnica do laboratório de hematologia/HU, pela ajuda com a coloração das lâminas de *citospin*.

À FAPESC, pelo suporte financeiro;

Aos funcionarios do Laboratório do HU, notadamente Luiz e Marcio Gil do setor de microbiologia.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho,

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a contribuição da PCR em cultivos precoces de micobactérias em meio sólido, possibilitando um diagnóstico laboratorial rápido, principalmente nos casos em que a baciloscopia é negativa. E para isso foram coletadas 40 amostras de escarro de pacientes TB+ recém-internados e sem tratamento. Em cada amostra, foi realizado o teste de baciloscopia, PCR do DNA extraído do escarro, cultura em meio Löwenstein-Jensen e PCR do DNA extraído do cultivo precoce diariamente. A baciloscopia apresentou sensibilidade de 68,57%, especificidade de 80% tendo a cultura como padrão-ouro, valor preditivo positivo de 96% e valor preditivo negativo de 26,67%. A cultura em meio sólido de 28 dias foi o que apresentou melhor resultado de sensibilidade (74,29%) e especificidade (100%) e foi o ponto de corte para cultura. Em DNA extraídos de amostras de escarro a PCR com iniciadores MYC, para amplificação do fragmento de 1027 pb do gene 16s RNA, apresentou sensibilidade de 22,86% e especificidade de 60% quando utilizada a cultura como padrão-ouro. E a PCR realizada em DNA extraídos dos cultivos precoces mostrou que a partir do 17^o. dia, os valores de sensibilidade (85,71%) e especificidade (60%) se mantêm constantes até o 40^o. dia. O cultivo precoce de 17 dias se mostrou uma boa alternativa de teste para tuberculose na tentativa de se abreviar o tempo de diagnóstico laboratorial, possibilitando assim intervenção na cadeia de transmissão da doença.

Palavras-chave: tuberculose, micobactérias, PCR, cultura

ABSTRACT

The aim of this work was evaluate the contribution of PCR in early solid medium culture and enable a rapid diagnostic of tuberculosis, mainly in the cases of negative smear. Fourty sputum samples were collected from inpatients with tuberculosis and without treatment. In each sample, smear, PCR from sputum, culture in LJ medium and daily PCR from early culture were realized. Smear showed sensivity 68,57%, specificity 80%. Culture in LJ médium was the gold-standard. The positive predictive value was 96% and negative predictive value was 26,67%. Culture with 28 days showed 74,29% of sensivity and 100% of specificity. PCR in DNA extracted from sputum with MYC primers amplified a fragment with 1027 pb of the 16s RNA gene. It had 22,86% of sensivity and 60% specificity. And PCR realized with DNA extracted from daily early culture showed the 17^o day until 40o day, the values of sensivity (85,71%) and specificity (60%) keep constants. Then early culture with 17 days is a good choice when the aim is to have a rapid diagnostic and interfere in the transmission chain of tuberculosis.

Key-words: tuberculosis, mycobacteria, PCR, culture

SUMÁRIO

Lista de tabelas e figuras.....	10
Lista de abreviaturas.....	11
1. Introdução.....	12
1.1. Tuberculose.....	13
1.2. As micobactérias.....	13
1.2.1. Estrutura e características.....	14
1.3. Genoma.....	15
1.4. Patogenia.....	16
1.5. Epidemiologia.....	17
1.6. Diagnóstico laboratorial.....	19
1.7. Isolamento e identificação.....	20
1.7.1. Testes de rotina.....	20
2. Justificativa.....	24
3. Objetivos.....	28
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. Materiais e métodos.....	30
4.1. Comitê de ética.....	31
4.2. Amostras clínicas de escarro.....	31
4.3. Métodos de coloração.....	31
4.3.1. Coloração para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) – Baciloscopia.....	31
5. Resultados.....	37
5.1. Amostragem.....	38
5.2. Baciloscopia.....	38
5.3. Cultura em meio Löwenstein-Jensen.....	38
5.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	40
5.5. Controle das extrações de DNA.....	40
5.6. Análise estatística.....	41
5.6.1. Baciloscopia.....	42
5.6.2. Cultura em meio Löwenstein-Jensen.....	42
5.6.3. PCR em amostras de cultivo precoce em meio sólido.....	44
5.6.4. Comparação dos resultados.....	46
6. Discussão.....	48
6.1. Reações de amplificação.....	50
6.2. Baciloscopia.....	51
6.3. Cultura.....	52
6.4. Análise estatística.....	53
7. Conclusão.....	56
8. Perspectivas.....	59
9. Referências.....	61
10. Anexos.....	68
Anexos 1.....	69
Anexos 2.....	70

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do fluxo metodológico adotado.....	32
Figura 2. Campo microscópico de esfregaço de escarro corado pela técnica de Ziehl-Neelsen e lido em microscopia de campo claro com objetiva de 10X e ocular de 100X.....	38
Figura 3. Tubos com meio de Löwenstein-Jensen, semeados com a amostra 101, apresentando crescimento micobacteriano.....	39
Figura 4. Separação eletroforética do produto de PCR amplificado de DNA extraído de amostras de escarro e de cultivo precoce.....	40
Figura 5. Separação eletroforética do produto de PCR do DNA extraído de amostras de escarro com iniciadores ZR-244 e F-285.....	41
Tabela 1. Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da baciloscopia tendo como padrão-ouro a cultura em meio LJ.....	42
Tabela 2. Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da cultura.....	42
Tabela 3. Valores de razão de chance (<i>odds ratio</i>), intervalo de confiança (CI) de 95%, valor estatístico <i>z</i> e <i>P</i> para cultura em meio sólido.....	43
Tabela 4. Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para a PCR do escarro e de diferentes dias de cultivo precoce.....	44
Figura 6. Curvas ROC para as culturas de 21 dias (A) e de 28 dias (B).....	44
Tabela 5. Valores de razão de chance (<i>odds ratio</i>), intervalo de confiança (CI) de 95%, valor estatístico <i>z</i> e <i>P</i> para a PCR do escarro e de diferentes dias de cultivo precoce.....	45
Figura 7. Curva ROC para a PCR no cultivo precoce de 17 dias.....	46
Figura 8 Curva ROC com os valores de sensibilidade e especificidade das variáveis: baciloscopia, cultura de 21 dias, cultura de 28 dias, cultura de 40 dias, PCR de 17 dias e PCR de 40 dias.....	47
Figura 9. Representação esquemática do fluxograma para diagnóstico da tuberculose sugerido pelo nosso estudo.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS** – Síndrome da Imunodeficiência Humana
- BAAR** – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
- BCG** – Bacilo de Calmette-Guérin
- CEPSH** – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
- CI** – Intervalo de Confiança
- CONEP** – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
- DOTS** – antiobiotico-terapia diretamente observada
- DMSO** – Dimetil-sulfóxido
- HAAT** – Terapia Antiretroviral Altamente Ativa
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- LACEN** – Laboratório Central
- LL** – Laboratório Local
- LJ** – Löwenstein-Jensen
- LRN** – Laboratório de Referência Nacional
- LRR** – Laboratório de Referência Regional
- MAC** – *Mycobacterium avium-intracellulari*
- MNT** – Micobactérias não-tuberculosas
- MTB** – *Mycobacterium tuberculosis*
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- ROC** – Receiver Operator Characteristic Curve
- rRNA** – RNA ribossomal
- rDNA** – DNA ribossomal
- TAAN** – Testes de Amplificação de Ácido Nucléico
- TB** – Tuberculose
- tRNA** – RNA transportador
- WHO** – World Health Organization (organização mundial da saúde)
- ZN** – Ziehl-Neelsen

1. Introdução

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), bacilo de Koch (LOPEZ-MORENO, et al., 2000), conhecida desde a antigüidade pelos egípcios, gregos, árabes e outros povos do Oriente Médio e permaneceu como uma enfermidade sem importância durante o período feudal, até o aumento de sua ocorrência no período da urbanização capitalista, no final do século XIX, sendo chamada de a “grande peste branca”. Disseminou-se pelo mundo com o colonialismo e a expansão comercial do sistema capitalista (ROSSETTI, SPERHACKE, 2005). A TB permanece até os dias de hoje como uma doença endêmica de proporção internacional (HONG, 2001) e é a primeira causa de morte, em adultos, devido a um único agente infeccioso (NEONAKIS et al., 2008, ROSSETTI, SPERHACKE, 2005).

A estimativa é de que aproximadamente dois bilhões de pessoas ou a terça parte da população mundial abrigue o bacilo. Entretanto, mais preocupante é a constatação de que a cada ano, 8,8 milhões de pessoas desenvolvem a doença e cerca de dois milhões morrem, apesar da disponibilidade de fármacos antitubercúlicos eficazes (WHO, 2006, WHO, 2004, WHO-DYE, 2004, WHO, 2001). Estima-se que 200 milhões de pessoas desenvolverão a doença e 35 milhões morrerão de TB até o ano de 2020 (NEONAKIS et al., 2008). A alta taxa de mortalidade da tuberculose se deve, principalmente aos programas inadequados de tratamento em muitos países, particularmente aqueles em desenvolvimento (WHO, 2004, CDC, 2003, CDC, 2002).

1.2. As Micobactérias

A tuberculose pulmonar pode ser causada pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canettii*. No Brasil, o principal agente causal é o *Mycobacterium tuberculosis* (ROSSETTI, SPERHACKE, 2005, SOMOSKOVI, et al., 2008). A doença pulmonar por micobactérias outras que não o *Mycobacterium tuberculosis* era raramente diagnosticada em nosso meio; E, entretanto, após a epidemia pelo HIV, o aumento no número de pacientes convivendo com imunossupressão por outras causas que não o HIV e a melhoria dos métodos de identificação, várias espécies de

micobactérias não-tuberculosas (MNT) emergiram como patógenos importantes, cada uma delas com um potencial diferente para produzir doença e freqüentemente, com perfil específico de suscetibilidade aos antimicrobianos, o que deve ser determinado por testes laboratoriais (SOINI & MUSSER, 2001, KONEMAN et al., 1997).

O *M. tuberculosis* pertence à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, e é um dos componentes do complexo MTB, juntamente com *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii* (DJELOUADJI et al, 2008, ROSSETTI, & SPERHACKE, 2005).

1.2.1. Estrutura e Características

Até o momento existem em torno de 127 espécies de micobactérias descritas. Diversas espécies podem produzir doenças em humanos entre elas destacam-se as de crescimento rápido *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* que têm sido isoladas em surtos, principalmente de feridas cirúrgicas ou equipamentos médicos e mais raramente de amostras de escarro em indivíduos com doença pulmonar (VIANA-NIERO et al., 2008, BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002). Outras micobactérias que causam doença pulmonar indistinguível da tuberculose têm sido isoladas com freqüência cada vez maior de indivíduos HIV soro-positivos e soro-negativos com destaque para o complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), *M. smegmatis* e *M. kansasii* (KOH et al, 2008). Os bacilos do complexo MTB possuem alto conteúdo lipídico na parede celular, podendo atingir até 40% do peso seco da célula. Os bacilos são resistente à ação de agentes químicos, mas sensíveis a agentes físicos, como radiação ultravioleta e calor (VIANA-NIERO, 2008, BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002).

As micobactérias são álcool-ácido resistentes, em reações tintoriais e, em sua grande maioria, possuem crescimento lento em cultura, com um tempo de geração de aproximadamente 15 a 20 horas, dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e pH do meio. As micobactérias são aeróbias, não-formadoras de esporos e não possuem motilidade. A morfologia das colônias varia entre as espécies,

apresentando aspecto liso ou rugoso, pigmentado ou não pigmentado (ROSSETTI, & SPERHACKE, 2005).

A parede celular de micobactérias é composta por ácidos micólicos, ceras complexas e glicolipídios exclusivos. Os ácidos micólicos contêm cadeias laterais extremamente longas, variando entre 60 e 90 carbonos, que são unidas aos ácidos murâmicos dos peptidoglicanos por pontes fosfodiéster e aos arabinogalactanos por ligações de glicolipídios esterificados. As diferentes espécies são caracterizadas por variações nas substituições de açúcares nos glicolipídios ou peptidolipídios (McMURRAY, 1996).

O procedimento de coloração pela resistência álcool-ácido conta com a vantagem - da exclusiva das micobactérias - de ligação ao corante. Esta propriedade está relacionada com a presença de ácidos micólicos covalentemente ligados a grupamentos hidroxil 5' nos polímeros de arabinogalactanos da parede celular (BLANCHARD, 1996).

1.3 Genoma

Mycobacterium tuberculosis H37Rv é a micobactéria mais utilizada em pesquisas laboratoriais. Seu genoma foi completamente seqüenciado e descrito por Cole et al. em 1998, e revisado por Camus et al. em 2002.

Mycobacterium tuberculosis H37Rv tem um genoma circular com 4.411.529 pares de base, contendo 65,6% de citosina (C) + guanina (G) com pelo menos 4.044 genes. Desses, 99 estão relacionados à virulência, 233 ao metabolismo de proteínas, 229 a vias de informação, 708 com parede celular e processos celulares, 149 se relacionam com seqüências de inserção, 170 correspondem a proteínas PE (PRO-GLU) e PPE (PRO-PRO-GLU) que parecem estar relacionadas com antigenicidade, 894 com metabolismos intermediários e respiração, 272 genes produzem proteínas de função desconhecida, 189 produzem proteínas regulatórias, 1.050 produzem proteínas hipoteticamente conservadas e 50 genes são de RNA estáveis (COLE et al., 1998, CAMUS et al., 2002).

Micobactérias de crescimento lento e de crescimento rápido diferem no número de operons rRNA (RNA ribossomal). As de crescimento rápido, como *Mycobacterium*

smegmatis, geralmente tem dois operons rRNA, enquanto que as de crescimento lento, incluindo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*, tem um operon (NINET et al., 1996).

O operon é transcrito como unidade para posteriormente ser processado nos rRNA maduros 16S rRNA, 23S rRNA e 5S rRNA (FROTHINGHAM et al., 1994).

O 16S rRNA é uma seqüência de aproximadamente 1.500 nucleotídeos codificados pelo 16S DNA ribossomal (rDNA). Esse gene é altamente conservado em regiões comuns a todos os seres vivos enquanto as variações de nucleotídeos estão concentradas em áreas específicas. No 16S rDNA de micobactérias, existem trechos de nucleotídeos compartilhados por todos os membros do gênero *Mycobacterium*. E também, regiões hipervariáveis, caracterizadas por variabilidades espécie-específicas (WOESE, 1987, TORTOLI, 2003).

Dentre as regiões variáveis do 16S rRNA de eubactérias, a região correspondente aos nucleotídeos 200 a 240 de *E. coli* pode ser utilizada para fazer determinações espécie-específicas de micobactérias. A análise das seqüências desta região mostra pequenas, porém consistentes, variações de nucleotídeos (BÖDDINGHAUS et al., 1990).

O genoma de *M. tuberculosis* possui dezesseis cópias das denominadas seqüências promíscuas de inserção IS6110 e seis cópias das seqüências de inserção IS1081 consideradas mais estáveis, além de outras 32 seqüências. Muitas das seqüências de inserção parecem estar inseridas nas regiões intergênicas ou regiões não codificadoras, freqüentemente próximas aos genes de tRNA (RNA transportador) que estão distribuídos ao longo do genoma. Muitas estão agrupadas e sugerem a existência de pontos de inserção (*hot-spots*) que protegem o gene de inativação (COLE et al., 1998, GORDON et al., 1999).

1.4. Patogenia

A tuberculose pode se desenvolver como resultado de reativação de um foco latente de uma infecção prévia, doença progressiva primária, abandono de tratamento ou reinfecção. A ocorrência da doença em decorrência de infecções latentes pode surgir anos ou décadas depois de uma infecção inicial e esta reativação é

freqüentemente devido a uma mudança nas condições do sistema imunológico do indivíduo. Um indivíduo é geralmente infectado por MTB pela inalação de aerossol contendo bacilo. A TB também pode ser contraída por ingestão ou por inoculação traumática da pele. Uma vez inalado o bacilo, vários fatores vão influenciar a probabilidade de ocorrência da infecção, estima-se que em torno de 5% das pessoas expostas ao MTB desenvolvem a doença (LI et al., 2002). A TB extrapulmonar é mais comum em pacientes HIV soro-positivos. Tuberculose pulmonar não-tratada freqüentemente progride causando danos ao pulmão resultando em cavidades necróticas. Isso causa irritação severa produzindo tosse, que ajuda a dispersar a micobactéria, facilitando a transmissão da doença. A extensão da patogenia e disseminação da TB é dependente da resposta imune do paciente e dos fatores de virulência da bactéria (HUGGETT et al., 2003).

1.5. Epidemiologia

No mundo desenvolvido, as taxas de morbidade e mortalidade por TB diminuíram drasticamente, durante o século XX, principalmente devido à melhoria das práticas de saúde pública, ao amplo uso da vacina *M. bovis* BCG e ao desenvolvimento de antimicrobianos a partir de 1950. No entanto, na segunda metade da década de 1980 a tendência de queda acabou e o número de novos casos aumentou. As principais causas que contribuíram para isto incluem o aumento do número de pessoas sem teto e a pobreza no mundo, além da emergência da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (SMITH, 2003). Por outro lado, as regiões em desenvolvimento continuam sofrendo com a TB, onde acontece uma morte por tuberculose a cada 15 segundos (SMITH, 2003).

Da incidência mundial anual estimada de TB em 2005 foi de 136 casos por 100.000 habitantes, 80% desses casos ocorrem em 23 países, situados principalmente no sudeste asiático, oeste do Pacífico e África. Das Américas, apenas dois países integram esta relação, o Peru que ocupa o 23º lugar, com 58.000 casos e o Brasil em 14º, com 112.000 casos (WHO, 2008). O relatório da Organização Mundial da Saúde de 2005, sobre o controle da tuberculose, mostra que a situação do Brasil

melhorou e o país, agora, ocupa o 15º lugar na lista decrescente dos países com maior número de casos (WHO, 2008).

No Brasil, a incidência estimada de TB é de 62 casos/100.000 habitantes (WHO, 2008). Dados do Ministério da Saúde, publicados no Anuário Estatístico de Saúde do Brasil, 2001, mostram uma incidência geral de 47,7 casos/100.000 habitantes. No entanto, a análise mais detalhada dos dados revela grande diversidade na incidência nos diferentes Estados da Federação como, por exemplo, Rio de Janeiro com 89,39 casos/100.000 habitantes, Amazonas com 74,79 casos/100.000, Minas Gerais com 33,2 casos/100.000 habitantes, enquanto o Distrito Federal apresenta 18,92 casos/100.000 habitantes (www.datasus.gov.br). O II Consenso Brasileiro de Tuberculose (CASTELO FILHO, et al., 2004) considera superestimado o número de casos atribuídos pela Organização Mundial de Saúde ao Brasil, e afirma que os parâmetros e as variáveis usadas para medir a tuberculose no País não são confiáveis.

O Estado de Santa Catarina apresenta uma incidência global de 27 casos/100.000 habitantes e uma distribuição muito heterogênea no número de casos. O município de Itajaí apresenta a maior incidência com 84,7 casos/100.000 habitantes, seguido por Joinville com 46,2 casos/100.000 habitantes, enquanto São Miguel do Oeste apresenta 4,2 casos/100.000 habitantes, sendo esta a menor incidência no Estado. Florianópolis apresenta 22,8 casos/100.000 habitantes. A região de Itajaí apresenta também elevada prevalência da infecção pelo HIV (SPS/DIVE/SES, 2008).

Ao contrário da tendência nos países industrializados, o número total de novos casos de TB continua aumentando nos países em desenvolvimento e é esperado um aumento dramático nas regiões mais devastadas pelo HIV (WHO, 2001). O HIV altera a epidemiologia da TB porque promove, em indivíduos infectados, a progressão da infecção latente para doença e favorece o desenvolvimento da primo-infecção. A infecção pelo HIV é o maior fator de risco para ativação da TB latente. Em alguns países africanos pelo menos 70% dos indivíduos com TB são co-infectados pelo HIV (SLOTAR et al., 2002).

A epidemia pelo HIV em muitos países também favoreceu concomitantemente o aumento, igualmente dramático, de novos casos de TB. A co-infecção HIV/TB

continua aumentando, mesmo em países com programas bem organizados para controle da tuberculose que adotam inclusive antibiótico-terapia diretamente observada – DOTS (WHO, 2008). Esta constatação indica que o HIV está impulsionando a epidemia de tuberculose e, que a adoção da DOTS parece não ser suficiente para o controle, sendo necessário implementar programas que controlem simultaneamente as infecções por TB e por HIV. As elevadas morbidade e mortalidade por TB em indivíduos vivendo com HIV fizeram com que a detecção, o tratamento e a prevenção da TB sejam prioridades nos programas nacionais de controle da AIDS (WHO, 2008).

Para cada dez indivíduos imunocompetentes, um apresenta chance de desenvolver TB ao longo de sua vida, enquanto, entre indivíduos infectados pelo HIV um em cada dez a cada ano irá desenvolver TB. Entre pacientes com Aids, um em cada dois ou três que apresentarem prova tuberculínica - PPD, positiva, desenvolverão TB (NTC, 1996). Entretanto, a partir de 1996 com a introdução da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART) para o tratamento da infecção pelo HIV, observou-se em algumas regiões que houve impacto positivo também sobre a co-infecção com micobactérias, diminuindo o número de casos de TB (DEAN et al., 2002, WOLF, O'DONNELL, 2001, SILVEIRA et al., 2006).

1.6. Diagnóstico Laboratorial

A Organização Mundial da Saúde - OMS, no seu programa especial para pesquisa e treinamento em doenças tropicais, manifestou preocupação em relação ao diagnóstico e tratamento da tuberculose nos países em desenvolvimento, afirmando que: “Como tem crescido o número de países em que o tratamento curativo para TB está disponível, o impedimento primário para o controle da doença está na inadequada detecção de casos. A pandemia pelo HIV, a imunossupressão ligada ou não ao HIV e o aumento mundial da resistência da bactéria aos fármacos, aumentam grandemente a necessidade de melhorar as ferramentas diagnósticas” (WHO, 2001, MALIK, et. al. 1998, BRASIL, 2002).

Mesmo que o diagnóstico inicial da doença micobacteriana esteja freqüentemente baseado em dados clínicos, o diagnóstico definitivo depende do isolamento e da

identificação, em laboratório, do organismo. Os procedimentos laboratoriais para espécimes clínicas envolvem a descontaminação, a análise microscópica da presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), o isolamento da bactéria em cultura, a identificação e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Devido ao lento crescimento das micobactérias, o isolamento, a identificação e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos podem demorar seis semanas ou mais (SOINI & MUSSER, 2001).

O Manual de Bacteriologia da Tuberculose do Ministério da Saúde - MS, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994) apresenta o Plano Emergencial para o Controle da Tuberculose, objetivando cobrir 100% dos municípios brasileiros, manter 80% dos centros de saúde pública com ações de diagnóstico e tratamento da tuberculose, identificar 90% dos casos existentes e curar 85% dos casos descobertos. Além disto, o Manual apresenta a hierarquização da Rede de Laboratórios de Saúde Pública, constituída por um Laboratório de Referência Nacional - LRN, sete Laboratórios de Referência Regionais – LRR, vinte e sete Laboratórios de Referência Estadual – LRE e Laboratórios Locais – LL, nos municípios, em números variáveis em cada Estado brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994).

No Estado de Santa Catarina o LRE (Lacen – Laboratório Central de Saúde Pública) realiza, entre outras atividades, a supervisão das baciloscopias realizadas nos LL, todas as culturas e todos os testes de sensibilidade do Estado e faz a identificação das cepas de *M. tuberculosis*. As culturas com micobactérias diferentes de *M. tuberculosis* são enviadas para o LRN Prof. Hélio Fraga, situado no Rio de Janeiro (LACEN/SC).

1.7. Isolamento e Identificação

1.7.1. Testes de rotina

O Manual de Bacteriologia da Tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994) descreve as técnicas recomendadas para assegurar melhor rendimento dos exames (CASTELO FILHO et al., 2004). As técnicas mais utilizadas são: a baciloscopia pelo método de coloração de Zielh-Neelsen (ZN), a cultura em meio Löwenstein-Jensen - LJ, após descontaminação da amostra pelo método de Petroff e o teste de

sensibilidade aos antimicrobianos pelo método das proporções em LJ (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994; CASTELO FILHO et al., 2004).

A baciloscopia é o exame básico para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose, especialmente na forma pulmonar. Por ser de execução rápida, fácil e de baixo custo, favorece uma ampla cobertura diagnóstica, identificando a principal fonte de infecção (doentes bacilíferos) permitindo a pronta atuação e interrupção na cadeia de transmissão. Entretanto, para obter um resultado positivo na baciloscopia, é necessário pelo menos 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de escarro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994). A sensibilidade da baciloscopia nos casos de TB pulmonar varia entre 50% e 80%. Um rendimento melhor é nitidamente associado aos cuidados de coleta e atenção à qualidade e ao volume da amostra. As taxas de detecção de casos de TB pulmonar pelo método de ZN podem ser melhoradas com a coleta de amostras sucessivas de escarro espontâneo. Foi evidenciado um rendimento de 83,4% na primeira amostra, acrescido de 12,2% na segunda amostra e de 4,4% na terceira amostra (CASTELO FILHO, 2004).

O isolamento de micobactérias em meio de cultura é o método bacteriológico mais sensível e específico, podendo ser realizado a partir de 10 bacilos por mililitro de escarro. A cultura possibilita diagnosticar mais precocemente os casos novos de tuberculose pulmonar, nos quais a eliminação bacilar não é suficiente para ser detectada pela baciloscopia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994).

O meio mais utilizado para o isolamento de micobactérias é o de Löwenstein-Jensen, que é um meio sólido à base de ovo e contém glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Este meio permite o crescimento da maioria das espécies micobacterianas de interesse médico. A utilização de piruvato de sódio como fonte de carbono ao invés de glicerol é recomendado para o isolamento de *M. bovis* e *M. africanum*. Outros meios sólidos como os Middlebrook 7H10 e 7H11 também podem ser utilizados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994).

O crescimento das micobactérias é melhor nos meios à base de ovo. Nos outros meios, o crescimento é mais rápido, especialmente nos meios líquidos. Esses meios líquidos são empregados nos métodos de detecção automatizados ou semi-automatizados, contudo paralelamente pelo menos uma cultura sólida em LJ deve

ser realizada, para garantia do isolamento das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que podem não crescer em outros meios (CASTELO FILHO et al., 2004).

Dentre os métodos de detecção automatizados ou semi-automatizados, em oposição à vantagem da detecção mais rápida do crescimento de micobactérias, vários deles estão sendo substituídos por apresentarem taxas de contaminação superiores às observadas com LJ e ou também, nos radiométricos, pelo problema de descarte de lixo radioativo. Dos testes comercializados, o sistema BACTEC-MGIT 960[®] (BM960) parece ter os melhores resultados já que apresenta semelhanças estatísticas com resultados obtidos no cultivo com LJ e por apresentar redução importante no tempo de crescimento, com média de 10,4 dias para o sistema BM960 contra 37,9 dias para LJ (CASTELO FILHO et al., 2004).

A principal amostra utilizada para diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar é o escarro, por ser de fácil obtenção. No entanto, este material é contaminado por bactérias constituintes da flora bucal e do trato respiratório superior que são, ao contrário das micobactérias, bactérias de crescimento rápido e por isso devem ser eliminadas sempre que a amostra for cultivada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994). O procedimento de descontaminação do escarro pode ser feito com N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio 2%. Entretanto, vários estudos demonstraram esse esse processo diminui consideravelmente o número de bacilos (CHENG et al., 2005).

Estudos com secreções traqueobrônquicas revelam a presença de muitos elementos neste material, entre os quais destacamos a lisozima e outras enzimas como a calicreína, que tem a capacidade de liberar pequenos polipeptídeos (quininas) do soro. Quininas causam contração do músculo liso, vasodilatação e outros efeitos. Existem outras enzimas que provavelmente se originam de células mortas ou danificadas, como: desidrogenase láctica e deoxiribonucleases (DNAses) (YAGER, 1971). A presença de enzimas proteolíticas também não está descartada, uma vez que há a tendência do gel de secreções traqueobrônquicas se dissolverem durante estocagem (YAGER, 1971).

Classicamente, a identificação da espécie de micobactéria isolada é feita pelo estudo morfológico das colônias nos meios sólidos, pelo tempo de crescimento, pela produção de pigmento, pelo crescimento em presença de inibidores e por testes

bioquímicos. Estes procedimentos são laboriosos e demandam tempo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994; CASTELO FILHO et al., 2004).

2. Justificativa

No dia 24 de março de 1882, o médico alemão Robert Kock descreveu o agente causador da tuberculose: o bacilo de Kock. Desde então, importantes avanços científicos foram realizados, mas não foram suficientes para controlar a doença. A tuberculose é uma doença com profundas raízes sociais e está intimamente ligada à pobreza e à má distribuição de renda. Continua sendo um grave problema de saúde pública e está incluída na lista das prioridades do Ministério da Saúde (SPS/DIVE/SES, 2008).

Desde 1998, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose (TB) como estado de emergência mundial por ser, ainda, a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos (WHO, 2008). A estimativa é de 8 milhões de novos casos de TB por ano, dos quais, em torno de 3,5 milhões de casos (44%) desenvolverão a doença pulmonar que será diagnosticada pela baciloscopia (TUELLER et al., 2005). Não estando disponíveis os dados prospectivos de número de casos diagnosticados caso sejam adicionados à baciloscopia outros métodos mais sensíveis.

Atualmente dois grandes obstáculos agravam a situação da doença: a infecção pelo HIV/Aids que predispõe o indivíduo infectado a desenvolver a tuberculose; e o abandono ao tratamento que favorece a seleção de cepas resistentes aos antitubercúlicos (SPS/DVE/SES, 2008).

O melhor recurso de prevenção disponível no sistema de saúde continua sendo a detecção precoce e o tratamento supervisionado dos casos (WHO, 2008).

O diagnóstico precoce tem um papel vital no controle da TB. Entretanto, a metodologia convencional, que inclui baciloscopia, cultura em meio Löwenstein-Jensen e identificação das micobactérias por testes bioquímicos, é lenta e leva várias semanas (NEONAKIS et al., 2008). Além de apresentar uma sensibilidade baixa, principalmente, em amostras clínicas com pequeno número de bacilos (NEGI et al., 2005).

A baciloscopia detecta somente 50% a 60% dos casos de tuberculose pulmonar. A cultura, considerada o padrão ouro, melhora a sensibilidade em 20%, mas tem um intervalo de tempo de 6 a 8 semanas até que o resultado esteja disponível

(MATTHYS et al., 2008). Soma-se a isso, a dificuldade de identificação de micobactérias outras que não o *M. tuberculosis* (MNT).

A reversão deste panorama demandará no desenvolvimento de novas estratégias para aumentar a qualidade do diagnóstico da TB, com uma detecção mais eficiente (WHO, 2008). A estimativa é a de que o aumento da detecção de casos deverá reduzir a incidência em 41% em 20 anos, ao passo que novos esquemas terapêuticos deverão reduzir em até 59%, segundo modelos estatísticos descritos. A associação de novos métodos diagnósticos e novas drogas poderá determinar redução na incidência da ordem de 76%, nesse mesmo espaço de tempo (WHO, 2008).

Um dos avanços técnicos mais importantes para o controle da tuberculose tem sido o desenvolvimento de testes de amplificação de ácido nucléico (TAAN) que possibilitam a detecção precoce do bacilo e contribuem para barrar a disseminação da doença. Há necessidade da adequação dos métodos baseados em DNA ou RNA para o diagnóstico de TB em amostras clínicas (PERKINS, 2000).

A detecção do DNA de micobactérias diretamente do escarro pela amplificação do gene 16sDNA é desejável, uma vez que possibilita a identificação rápida da espécie (WALÉRIO-ALEIXO, 2000). A amplificação desse gene no escarro tem se mostrado desafiadora por apresentar valores de sensibilidade muito aquém dos esperados para o diagnóstico (BAZZO, 2006). Em virtude disso, entendemos que a eficiência da amplificação pela PCR está diretamente ligada à qualidade do DNA e este, por sua vez, depende do tipo da amostra e do método de extração.

O escarro é composto em torno de 95% de água e 1% de carboidratos, proteínas, lipídios, imunoglobulinas, lactoferrina bronquial, enzimas como lisozima, células escamosas, leucócitos, células do epitélio bronquial e ainda, toda flora bacteriana do trato respiratório superior (YAGER, 1971). E, por isso, estudamos sua qualidade por meio da análise do número de células viáveis (leucócitos vivos) em relação às células escamosas e leucócitos mortos. Determinamos a viabilidade e a qualidade da amostra de escarro para melhorar o rendimento da PCR. Artigo submetido para integralização da disciplina FAR 3041 – redação de artigo científico I.

Mesmo tendo concluído que a qualidade da amostra influencia no rendimento da PCR, deparamo-nos com dois problemas: O primeiro é que o número de amostras com boa qualidade é pequeno e a aceitação apenas de amostras de boa qualidade tornaria muito difícil o dia-a-dia dos laboratórios. E o segundo é que o valor da sensibilidade encontrado para amostras de boa qualidade ainda é baixo. Por isso, este trabalho se propõe comparar a PCR no escarro e em cultivos precoces, ou seja, tratar o escarro para sua semeadura em meio de Löwenstein-Jensen e verificar todos os dias se este meio favorece a detecção de DNA de micobactérias mesmo em cultivos em que as colônias não são visíveis, ou seja, precoces. E desta forma, estabelecer alternativas de diagnóstico laboratorial objetivando uma intervenção precoce na cadeia de transmissão da tuberculose.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral:

Desenvolver uma técnica utilizando o cultivo precoce em meio Löweinstein-Jensen de amostras de escarro seguido de PCR para a melhoria do diagnóstico laboratorial da tuberculose.

3.2. Objetivos específicos:

1. Testar o rendimento da baciloscopia para o diagnóstico da tuberculose;
2. Verificar o número de dias em que o diagnóstico laboratorial pode ser abreviado com a associação de cultivo precoce seguido de PCR para o diagnóstico laboratorial da tuberculose;
3. Testar a sensibilidade da PCR para detecção do gene 16S rDNA em DNA extraído diretamente do escarro;
4. Testar a sensibilidade da PCR para detecção do gene 16S rDNA em DNA extraído de cultivo precoce;
5. Comparar os resultados da baciloscopia, cultura e cultivo precoce seguido de PCR;
6. Analisar e publicar os dados.

4. Materiais e métodos

4.1. Comitê de Ética

O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob número 227/2006 em 26/06/2006. O Parecer do CEPSH foi encaminhado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

4.2. Amostras clínicas de escarro

As amostras de escarro foram obtidas, de pacientes com diagnóstico clínico de tuberculose, recém-internados e com no máximo 2 dias de tratamento do Hospital Nereu Ramos. Essas amostras foram levadas ao Laboratório de Micobactérias e Biologia Molecular no Hospital Universitário (HU) e foram processadas dentro de 2 horas após a coleta para a realização dos testes de baciloscopia, cultura em meio sólido e PCR do escarro. O período de coleta foi de março a agosto de 2008. As amostras coletadas no período de março de 2007 a fevereiro de 2008 integraram o estudo de viabilidade conforme artigo “Quality of sputum in the performance of polymerase chain reaction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis” submetido ao International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases.

No total foram avaliadas 40 amostras de escarro. Cada amostra seguiu a seguinte rotina de análise: homogeneização e separação em três partes. Uma para a confecção da lâmina para baciloscopia (coloração por Ziehl-Nielsen), outra para extração de DNA e posterior PCR, e a terceira para o procedimento de descontaminação pelo método de Petroff e semeadura em tubos de cultura contendo meio sólido Löwenstein-Jensen. A figura 1 apresenta o fluxograma com as etapas metodológicas realizadas.

4.3. Métodos de Coloração

4.3.1. Coloração para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) – Baciloscopia

O preparo do esfregaço, a coloração de Ziehl-Neelsen e a leitura das lâminas seguiram as recomendações descritas no Manual de Bacteriologia da Tuberculose

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994). A coloração foi feita com fucsina fenicada a quente, sendo o processo de descoloração com álcool-ácido e a coloração de fundo com azul de metileno. A presença dos bacilos foi avaliada em vários campos microscópicos e os resultados apresentados em cruces de acordo com o número de campos analisados com objetiva de 100 X e, com ocular de 10X. O número de cruces foi definido da seguinte maneira: 3+ (três cruces) representam a presença mais de dez bacilos por campo em 20 campos; 2+ (duas cruces) correspondem a 1 a 10 bacilos por campo em 50 campos, 1+ (uma cruz) corresponde a um total de 10 a 99 bacilos em 100 campos. A presença de um a nove bacilos nos 100 campos foi re(F)latada com o número exato de bacilos encontrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994).

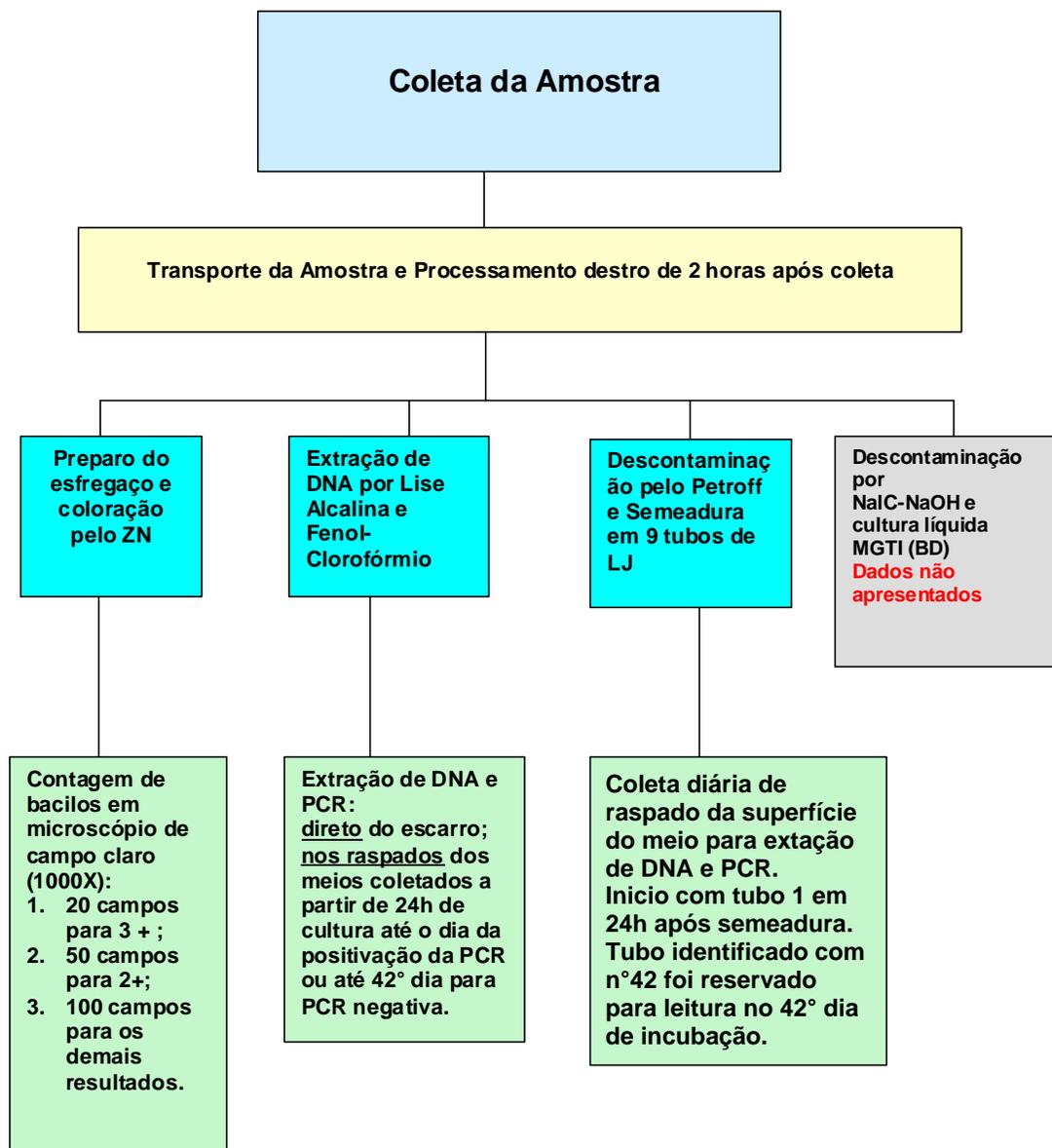


Figura 1: Representação esquemática do fluxo metodológico adotado

4.4. Detecção e Identificação Molecular

4.4.1. Extração de DNA

4.4.1.1. Das Amostras Clínicas de Escarro

Foi separado um volume em torno de 400 µl de escarro para a extração do DNA de acordo com o protocolo de lise alcalina - DHAP (SAMBROOK & RUSSEL, 2001): o escarro foi ressuspense em GTE (Glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris/Cl pH 8,0 25 mM), seguido da lise celular com SDS 1%/NaOH 0,2 M. O pH da solução foi neutralizado com solução de acetato de potássio 3M pH 4,8 – 5,0. Em seguida, a amostra foi tratada com proteinase K 20 mg/ml. A extração foi feita com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e o DNA precipitado em álcool etílico em presença de sal e ressuspense em 20 µl de TE (10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA).

4.4.1.2. Controle da Qualidade da Extração de DNA

O controle do DNA extraído de amostras clínicas e a verificação da presença de inibidores da reação de PCR foram feitos pela amplificação do fragmento de 350 pb utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores ZR-244 e F-285 do gene 16S RNA (ROGALL et al., 1990).

4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para Micobactérias

4.5.1. Oligonucleotídeos iniciadores

Os iniciadores para a PCR foram obtidos da seqüência do rDNA correspondente aos nucleotídeos do gene 16S rRNA (HUGHES *et al.*, 1993). A posição das bases foi dada de acordo com a seqüência do 16S RNA do *Mycobacterium tuberculosis* depositado no Gen Bank acesso de número X58890 e corresponde a porções altamente conservadas do gene. O iniciador anti-senso é designado de MYC-264 (BÖDDINGHAUS *et al.*, 1990) nucleotídeo 1638 a 1657 (3'-TGACACA GGCCACAAGGGA-5') e o iniciador senso é denominado de F-285 (ROGALL et al., 1990) nucleotídeos 631 a 648 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3').

A amplificação pela PCR para a detecção de micobactérias nas amostras clínicas foi feita pela utilização dos iniciadores específicos, o F-285 e o MYC-264, que amplificam um fragmento de 1027 pb.

4.5.2. As condições da PCR

A reação de PCR foi feita em volume de 50 μ l na presença de dimetil sulfóxido (DMSO), nas seguintes condições: 1,5 mM MgCl₂, 1% DMSO, 0,8 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 μ moles de cada iniciador; tampão de Taq polimerase 1X e 1,25 U Taq polimerase recombinante (Invitrogen).

A condição ótima de amplificação utilizada para os iniciadores ZR-244 e F-285 foi de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos em 35 ciclos e um ciclo final de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por dez minutos.

A condição de amplificação utilizada para os iniciadores MYC-264 e F-285 foi de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto em 35 ciclos e um ciclo final de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por dez minutos.

Na tentativa de padronização da metodologia, foi utilizado 1 μ l de DNA extraído das amostras, sem ter sido levada em consideração a concentração obtida. As PCR foram realizadas em um termociclador para PCR marca Eppendorf®, modelo Mastercycle Personal.

4.6. Separação Eletroforética do DNA

A separação eletroforética dos DNA extraídos e dos produtos de PCR foi feita com aplicação de 5 μ l de cada um destes materiais acrescidos de 1 μ l de tampão de amostra 6X (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cyanol e 10% 10X TAE –Tris-acetato 40 mM/EDTA 1 mM) em gel de agarose a 1% (p/v), em tampão TAE 1X a 200V durante dez minutos. A visualização foi feita pela coloração com brometo de etídio (1 μ g/ml).

Os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 320nm (HOEFER-MacroVue UV-20), utilizando-se um sistema de foto-documentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular 50pb (Ludvig®).

4.7. Amostra-Padrão

A amostra-padrão utilizada como controle-positiva de amplificação da PCR foi DNA extraído da vacina BCG que contém o bacilo de Calmette-Guérin atenuado.

4.8. Cultivo em meio Löwenstein-Jensen (LJ)

As amostras foram cultivadas após descontaminação pelo método de Petroff (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994). A cada amostra foi adicionado NaOH 4% (v/v) e a mistura homogeneizada e incubada entre 35°C e 37°C. Após 15 minutos de incubação foi verificado se a amostra estava fluida o suficiente para ser utilizada, caso contrário, a amostra foi homogeneizada e incubada novamente, com verificação da fluidez a cada cinco minutos, num tempo máximo de 30 minutos de incubação. Em seguida, foi adicionado à amostra o mesmo volume de água destilada estéril e a neutralização foi feita com adição de HCl 1N, contendo 0,004% do indicador vermelho de fenol, para indicar a neutralização do hidróxido de sódio utilizado. Após centrifugação a 3000 x g por 20 minutos, o precipitado foi ressuspenso em 1000 µl de solução salina e 100 µl foram semeados em nove tubos de cultura contendo meio de LJ. Os tubos com as culturas foram incubados inclinados, em temperatura variando entre 35 e 37°C. Os tubos foram numerados de 1 a 7, 14 e 42.

9. Raspagem da superfície do meio de cultura para coleta de amostra para PCR

Após 24 horas de cultivo, uma alíquota (raspagem) de cultura, com auxílio de um palito de madeira, foi retirada do tubo 1, e após mais 24 horas, uma outra alíquota foi retirada do tubo 2 e assim por diante até o tubo 7. Então a coleta retornou para o tubo 1 e sucessivamente, dia a dia, até o tubo 6 quando a coleta foi feita no tubo 14.

Esse processo foi feito até o dia em que a PCR se apresentava positiva, ou até o 42º dia para as negativas. O tubo com numerção 42 só foi aberto quando a cultura completava 42 dias.

Todos esses procedimentos foram realizados com objetivo de evitar, ao máximo, qualquer tipo de contaminação.

Todas as alíquotas coletadas seguiram o mesmo procedimento de extração de DNA, e PCR, conforme descritos nos itens 4.4.1 e 4.5. Entretanto, o raspado dos tubos de cultura foram ressuspensos em GTE.

Ao final de todo o procedimento com as 40 amostras, aproximadamente 415 PCR foram realizadas para cultivo em meio sólido.

Também foi observado se havia crescimento de colônia (figura 3) como preconizado pelo Ministério da Saúde (2004) e então foi anotado o tempo de crescimento bacteriano em meio sólido.

As culturas que não apresentaram crescimento bacteriano até 42 dias de cultivo foram consideradas negativas.

4. 10. Análise estatística

As estimativas ou índices de acurácia foram calculadas a partir dos dados obtidos utilizando-se o programa computacional *MedCalc for Windows*, versão 9.6.0.0 (*MedCalc Software, Mariakerke, Belgium*). Foram calculadas estimativas de sensibilidade, especificidade, *likelihood ratio* positivo e negativo (razões de verossimilhanças positiva e negativa ou razões de probabilidades), prevalência da doença (na amostra), valores preditivos (positivo e negativo) e os *odds ratio* (razão de chances) para cada avaliação realizada (ou estudo feito) com seus respectivos intervalos de confiança (95%).

5. Resultados

5.1. Amostragem

Um total de 40 amostras de escarro foi coletado de pacientes com diagnóstico clínico de tuberculose. Todas as amostras foram incluídas no estudo. A numeração do estudo inicia em 85 porque as amostras de 1 a 84 foram empregadas no estudo preliminar à dissertação para verificar a influência da qualidade das amostras de escarro nos resultados da PCR e que resultou no artigo “Quality of sputum in the performance of polimerase chain reaction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis”, submetido para publicação.

5.2. Baciloscopia

A baciloscopia foi positiva em 25 (62,5%) amostras (anexo 1). A Figura 2 mostra uma lâmina de baciloscopia, na qual se pode verificar a presença dos bacilos corados em vermelho pela fucsina. A PCR realizada diretamente do DNA extraído do escarro foi positiva em 14 (35%) amostras e negativa em 26 (65%). Não houve relação entre o número de cruzes (quantidade de bacilos na baciloscopia) e o resultado da PCR.

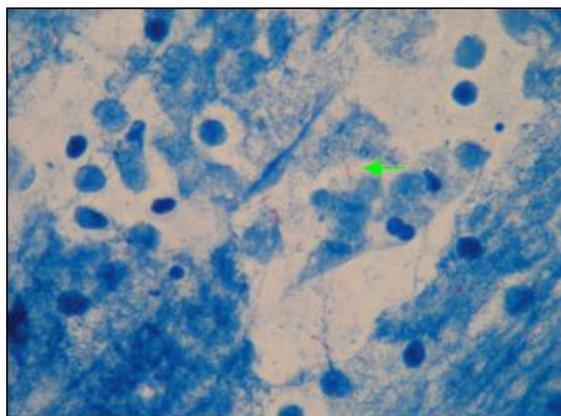


Figura 2: Campo microscópico de esfregaço de escarro corado pelo Ziehl-Neelsen e lido em microscopia de campo claro com objetiva de 10X e ocular de 100X. A seta em verde aponta um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR).

5.3. Cultura em meio Löwenstein-Jensen

Todas as amostras foram cultivadas em meio Löwenstein-Jensen (LJ). As que apresentaram PCR positiva no DNA extraído diretamente do escarro foram cultivadas conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (1994), tendo sido anotado o tempo de crescimento das colônias. As demais (26 amostras) também foram cultivadas, mas para essas, além da verificação diária do aparecimento de colônia, também foi realizada uma raspagem diária de uma parte da superfície do meio para coleta de uma alíquota para extração de DNA e realização da PCR. Das 40 amostras semeadas em cultura, 5 não apresentaram crescimento micobacteriano até o 42º dia, sendo que duas dessas amostras foram positivas na PCR do escarro. Das 26 amostras cultivadas e que não apresentaram PCR positivo no escarro, 23 (88,46%) foram positivas na PCR em dias variados e 3 (11,53%) amostras permaneceram negativas após a realização da 40ª PCR e também para cultura.

Do total de 40 amostras cultivadas, 5 (12,5%) foram negativas, 5 (12,5%) foram positivas com 7 dias de cultivo, 5 (12,5%) foram positivas em 14 dias, 6 (15%) foram positivas em 21 dias, 10 (25%) em 28 dias, 1 (2,5%) foi positiva em 40 dias e 8 (20%) em 42 dias de cultura. Ilustrando os tubos de cultivo e a visualização das colônias, a figura 3 mostra a cultura de número 101 que apresentou PCR positiva no escarro, e na cultura foi detectado crescimento micobacteriano em todos os tubos semeados a partir do 7º dia.



Figura 3: Tubos com meio de Löwenstein-Jensen, semeados com a amostra 101, apresentando crescimento micobacteriano.

O anexo 1 mostra a tabela com todos os resultados de baciloscopia, PCR no escarro, precocidade do cultivo pela PCR, e cultura em meio sólido para todas as amostras.

O anexo 2 mostra uma figura esquemática do quantitativo de PCR, dia da positividade da cultura em meio sólido, resultado da baciloscopia, para todas as amostras.

5.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A Figura 4 apresenta os produtos de PCR com iniciadores para micobactérias (Myc 264 e F285). As amostras 85 e 86 são uma amplificação direta do escarro. A amostra 89 é uma amplificação com 10 dias de cultivo e a amostra 100 é uma amplificação com 3 dias de cultivo. A amostra 108 é a PCR do 40º dia de cultivo. A amostra 114 é uma amplificação com 12 dias de cultivo.

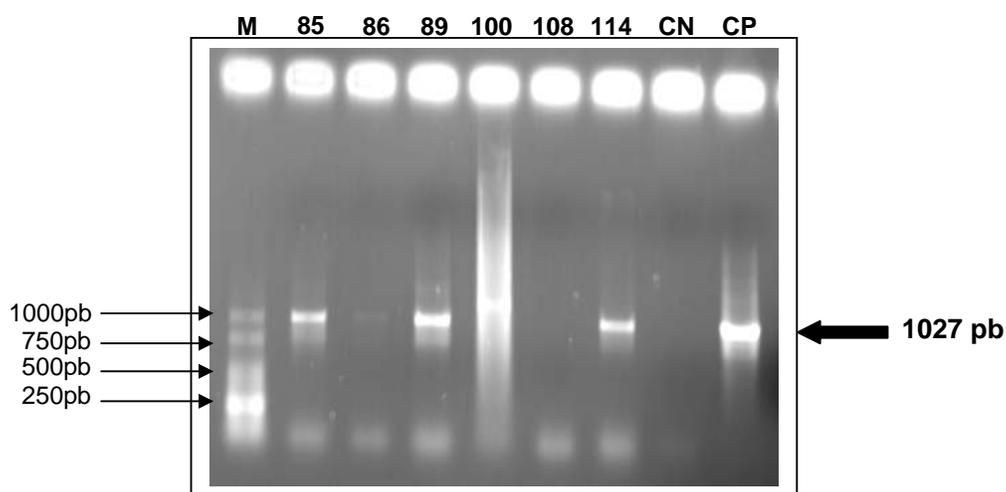


Figura 4. Separação eletroforética do produto de PCR amplificado de DNA extraído de amostras de escarro e de cultivos precoces. O DNA foi extraído por DHAP, amplificado com iniciadores MYC 264 e F 285 e os produtos de PCR (5µl) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados pelo brometo de etídio. M = marcador de tamanho molecular; os números 85, e 86, 89, 100, 108 e 114 correspondem a amostras que tiveram DNA extraído do escarro e de cultivo precoce, respectivamente. CN = controle negativo e CP = controle positivo (BCG).

5.5. Controle das Extrações de DNA

O DNA extraído foi amplificado pela PCR tendo sido utilizados os iniciadores F-285 e ZR-244, que amplificam um fragmento de 350 pb da região conservada do gene 16s RNA para a maioria das eubactérias e que serve como controle da extração de DNA, bem como para verificação da presença de inibidores da reação, por amplificarem a maioria das eubactérias. Todos os DNA extraídos de amostras de escarro, amostras de cultivo precoce que não amplificaram com os iniciadores específicos para micobactérias (MYC 264 e F285) foram amplificados com os iniciadores F-285 e ZR-244.

A amplificação do DNA do fragmento de 350 pb do gene 16s RNA pela PCR, a partir das extrações de amostras de escarro e de amostras de cultura com iniciadores para eubactérias ZR-244 e F-285 indicando a ausência de inibidores e a quantidade suficiente de DNA estão mostradas na Figura 5. O controle negativo da reação (CN) não apresentou amplificação e o controle positivo amplificou.

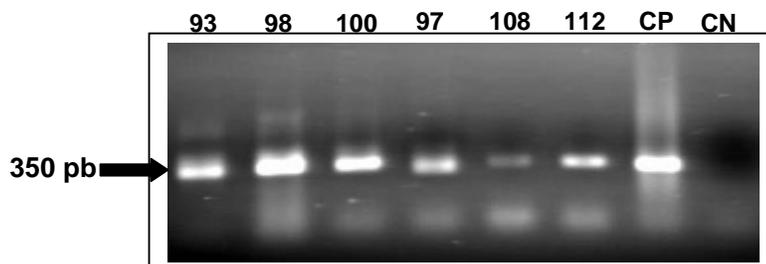


Figura 5. Produto de PCR amplificado do DNA extraído de amostras de escarro com iniciadores ZR-244 e F-285. Os números 93, 98, 100, 97, 108 e 112 correspondem às amostras clínicas de escarro. CP = controle positivo (BCG) e CN = controle negativo.

5.6. Análise estatística

Considerou-se avaliação cada estudo realizado intuindo o diagnóstico através da PCR (análise direta do escarro ou dia zero; e análises realizadas nos dias subseqüentes – primeiro ao quadragésimo dia de incubação em meio sólido), pelo crescimento em cultivo sólido direto (verificação de crescimento nos diferentes dias –

primeiro ao quadragésimo segundo) e pela baciloscopia realizada. Com exceção das estimativas de *odds ratio* todas as demais são expressas como percentagens.

5.6.1 Baciloscopia

A Tabela 1 mostra os valores de sensibilidade e especificidade (68,57% e 80,0%, respectivamente) da baciloscopia para a amostragem do nosso estudo, considerando a cultura como padrão-ouro, além dos valores preditivo positivo (96,0%) e negativo (26,67%).

Tabela 1: Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da baciloscopia tendo como padrão-ouro a cultura em LJ.

Baciloscopia	
Sensibilidade	68,57%
Especificidade	80,0%
Valor preditivo Positivo	96,0%
Valor preditivo Negativo	26,67%

5.6.2. Cultura em meio Löwenstein-Jensen

A Tabela 2 mostra os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo agrupados em diferentes períodos de incubação.

Tabela 2: Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da cultura – cultura 42 dias como padrao-aureo

	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
CULTURA 7-13 dia	14,29%	100%	100%	14,29%
CULTURA 14-20 dia	28,57%	100%	100%	16,67%
CULTURA 21-27 dia	45,71%	100%	100%	20,83%
CULTURA 28-39 dia	74,29%	100%	100%	35,71%
CULTURA 40 dia	77,14%	100%	100%	38,46%
CULTURA 42 dia	100%	100%	100%	100%

Na Tabela 3 estão listados todos os valores de razão de chance (*odds ratio*), intervalo de confiança (CI) de 95%, valor estatístico z e p para a cultura em meio sólido.

Tabela 3: Valores de razão de chance (*odds ratio*), intervalo de confiança (CI) de 95%, valor estatístico z e p para a cultura em meio sólido.

Amostras	Odds	95% CI	z statistic	P
CULTURADIA 7	1,984	0,0954 to 41,226	0,4420	0,6582
CULTURADIA 8	1,984	0,0954 to 41,226	0,4420	0,6582
CULTURADIA 9	1,984	0,0954 to 41,226	0,4420	0,6582
CULTURADIA 10	1,984	0,0954 to 41,226	0,4420	0,6582
CULTURADIA 11	1,984	0,0954 to 41,226	0,4420	0,6582
CULTURADIA 12	1,984	0,0954 to 41,226	0,4420	0,6582
CULTURADIA 13	1,984	0,0954 to 41,226	0,4420	0,6582
CULTURADIA 14	4,529	0,229 to 89,441	0,9930	0,3209
CULTURADIA 15	4,529	0,229 to 89,441	0,9930	0,3209
CULTURADIA 16	4,529	0,229 to 89,441	0,9930	0,3209
CULTURADIA 17	4,529	0,229 to 89,441	0,9930	0,3209
CULTURADIA 18	4,529	0,229 to 89,441	0,9930	0,3209
CULTURADIA 19	4,529	0,229 to 89,441	0,9930	0,3209
CULTURADIA 20	4,529	0,229 to 89,441	0,9930	0,3209
CULTURADIA 21	9,308	0,478 to 181,138	1,4730	0,1408
CULTURADIA 22	9,308	0,478 to 181,138	1,4730	0,1408
CULTURADIA 23	9,308	0,478 to 181,138	1,4730	0,1408
CULTURADIA 24	9,308	0,478 to 181,138	1,4730	0,1408
CULTURADIA 25	9,308	0,478 to 181,138	1,4730	0,1408
CULTURADIA 26	9,308	0,478 to 181,138	1,4730	0,1408
CULTURADIA 27	9,308	0,478 to 181,138	1,4730	0,1408
CULTURADIA 28	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 29	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 30	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 31	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 32	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 33	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 34	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 35	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 36	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 37	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 38	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 39	30,684	1,545 to 609,250	2,2450	0,0247
CULTURADIA 40	35,588	1,780 to 711,635	2,3370	0,0194
CULTURADIA 42	781	13,999 to 43571,250	3,2460	0,0012
Baciloscopia	8,727	0,871 to 87,451	1,8420	0,0654

Na Figura 6, em A, está representada a curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) para cultura de 21 dias de incubação. A área sob a curva tem valor de 0,729 e p de 0,0311, sensibilidade (S) de 45,7% e especificidade (E) de 100% . E em B está representada a curva ROC para cultura com 28 dias de incubação. A área sob a curva tem valor de 0,871 e p de 0,0001, sensibilidade (S) de 74,3% e especificidade (E) de 100%.

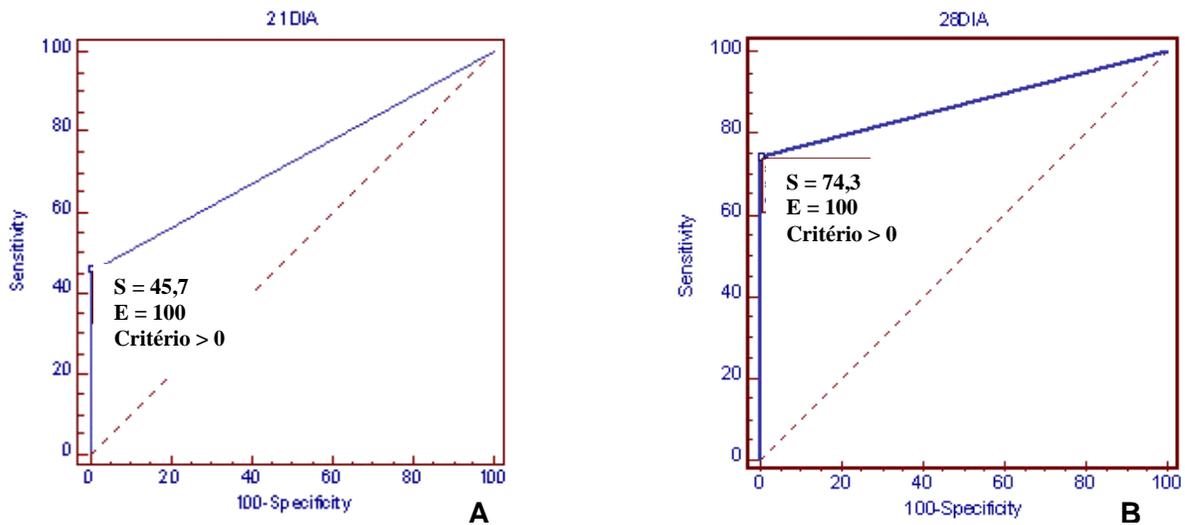


Figura 6: Curvas ROC para as culturas de 21 dias (A) e de 28 dias (B). A área sob a curva tem valor de 0,729 e P de 0,0311, sensibilidade (S) de 45,7% e especificidade (E) de 100% para 21 dias e de 0,871 e P de 0,0001, sensibilidade (S) de 74,3% e especificidade (E) de 100% para 28 dias.

5.6.3. PCR em amostras de cultivo precoce em meio sólido

A Tabela 4 mostra os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo agrupados em diferentes períodos de incubação para PCR em amostras de cultivo precoce em meio sólido.

Tabela 4: Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para a PCR do escarro e de diferentes dias de cultivo precoce.

	<i>Sensibilidade (%)</i>	<i>Especificidade (%)</i>	<i>Valor preditivo positivo (%)</i>	<i>Valor preditivo negativo (%)</i>
PCR escarro	22,86	60,0	80,0	10,0
PCR 1 dia	31,43	60,0	84,62	11,11
PCR 2 dia	40,0	60,0	87,50	12,50
PCR 3 e 4 dia	45,71	60,0	88,89	13,64
PCR 5 dia	48,57	60,0	89,47	14,29
PCR 6, 7, e 8 dia	51,43	60,0	90,48	15,0
PCR 9 dia	54,29	60,0	90,48	15,79
PCR 10 dia	60,0	60,0	91,30	17,65
PCR 11 dia	65,71	60,0	92,0	20,0
PCR 12 dia	68,57	60,0	92,31	21,43
PCR 13 dia	68,57	60,0	92,31	21,43
PCR 14 e 15 dia	80,0	60,0	93,33	30,0
PCR 16 dia	82,68	60,0	93,55	33,33
PCR 17 a 39 dia	85,71	60,0	93,75	37,50
PCR 40 dia	85,71	60,0	93,75	37,50

Na Tabela 5 estão listados todos os valores de *odds ratio*, 95% CI, valor estatístico *z* e *P* para PCR em amostras de cultivo precoce em meio sólido.

A análise de todos os valores obtidos define o ponto de corte para a PCR no cultivo precoce em 17 dias. Somente a partir desse dia, é que há significância estatística ($P < 0,05$). Todos os valores obtidos se mantêm constantes e não variam.

Tabela 5: Valores de razão de chance (*odds ratio*), intervalo de confiança (CI) de 95%, valor estatístico *z* e *P* para a PCR do escarro e de diferentes dias de cultivo precoce.

Amostras	Odds	95% CI	z statistic	P
ESCARRO	0,4440	0,0629 to 3,141	0,8130	0,4163
PCR1DIA	0,6870	0,100 to 4,719	0,3810	0,7030
PCR2DIA	1,0000	0,148 to 6,772	0,0000	1,0000
PCR3DIA	1,2630	0,187 to 8,520	0,2400	0,8104
PCR4DIA	1,2630	0,187 to 8,520	0,2400	0,8104
PCR5DIA	1,4170	0,210 to 9,548	0,3580	0,7205
PCR6DIA	1,5880	0,236 to 10,705	0,4750	0,6346
PCR7DIA	1,5880	0,236 to 10,705	0,4750	0,6346
PCR8DIA	1,5880	0,236 to 10,705	0,4750	0,6346
PCR9DIA	1,7810	0,264 to 12,015	0,5930	0,5533
PCR10DIA	2,2500	0,332 to 15,237	0,8310	0,4060
PCR11DIA	2,8750	0,421 to 19,621	1,0780	0,2811
PCR12DIA	3,2730	0,477 to 22,464	1,2060	0,2277
PCR13DIA	3,2730	0,477 to 22,464	1,2060	0,2277
PCR14DIA	6,0000	0,835 to 43,094	1,7810	0,0749
PCR15DIA	6,0000	0,835 to 43,094	1,7810	0,0749
PCR16DIA	7,2500	0,988 to 53,224	1,9480	0,0515
PCR17DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR18DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR19DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR20DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR21DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR22DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR23DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR24DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR25DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR26DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR27DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR28DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR29DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR30DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR31DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR32DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR33DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR34DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR35DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR36DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR37DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR38DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR39DIA	9,0000	1,189 to 68,136	2,1270	0,0334
PCR40DIA	11,6250	1,467 to 92,143	2,3230	0,0202
Baciloscopia	8,7270	0,871 to 87,451	1,8420	0,0654

A Figura 7 mostra a curva ROC para PCR de cultivo precoce em meio sólido com 17 dias de incubação. A área sob a curva tem valor de 0,729 e p de 0,0311, sensibilidade de 85,7% e especificidade de 60%.

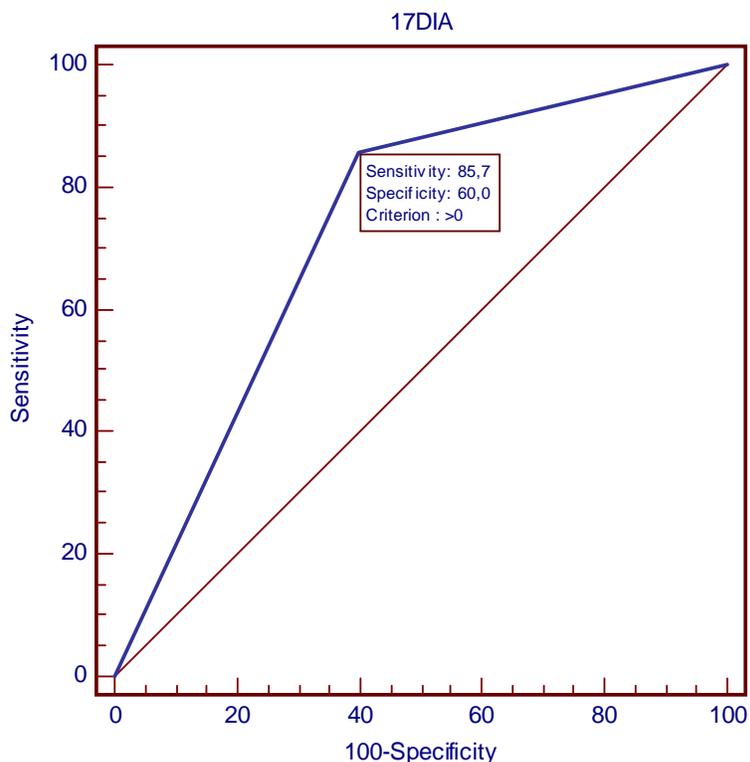


Figura 7: Curva ROC para a PCR no cultivo precoce de 17 dias. A área sob a curva tem valor de 0,729 e p de 0,0311, sensibilidade de 85,7% e especificidade de 60%.

5.6.4. Comparação dos resultados

A Figura 8 apresenta a curva ROC com os valores de sensibilidade e especificidade das variáveis: baciloscopia, cultura de 21 dias, cultura de 28 dias, cultura de 40 dias, PCR de 17 dias, PCR de 40 dias.

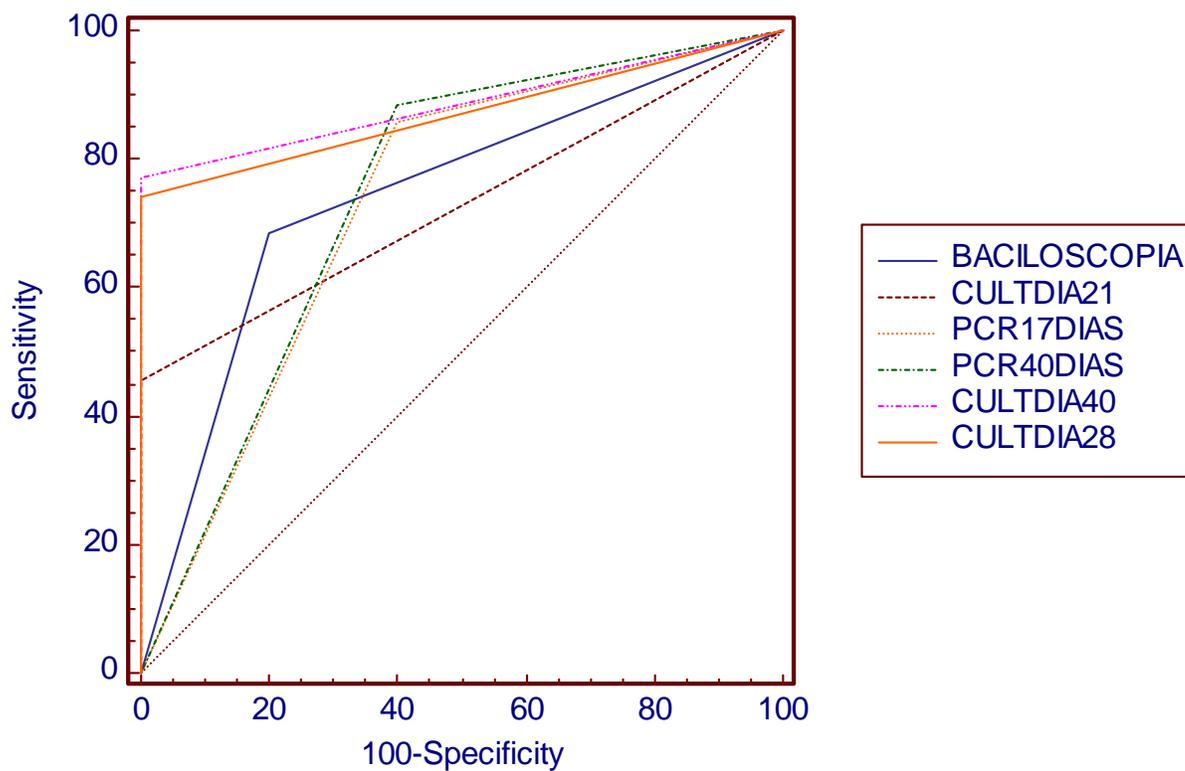


Figura 8: Curva ROC com os valores de sensibilidade e especificidade das variáveis: baciloscopia, cultura de 21 dias, cultura de 28 dias, cultura de 40 dias, PCR de 17 dias, PCR de 40 dias.

6. Discussão

A estratégia DOTS proposta pela OMS enfatiza a descentralização do diagnóstico para aumentar o acesso da população ao SUS enquanto se mantém a qualidade do cuidado por meio da supervisão, controle de qualidade e monitoramento do tratamento. O aumento na detecção de casos de TB pulmonar passou a ser considerado uma estratégia global adicional para o período de 2006 a 2009 (KRITSKI, 2006).

A amostragem deste estudo constituída de 40 escarros, inicialmente, pode parecer pequena, mas considerando o objetivo do trabalho, cada amostra poderia se converter em 40 outras amostras, dependendo do resultado da PCR. Na média, cada amostra originou 10 PCR e por isso, foram realizadas em torno de 415 PCR. Em outros estudos, esse quantitativo representaria 415 amostras, ou seja, um número amostral bastante expressivo considerando que no Estado de Santa Catarina são testadas anualmente cerca de 5.000 amostras, das quais 1.500 são positivas, conforme informação do Setor de Tuberculose/LACEN/SC e disponíveis nos relatórios da Diretoria de Vigilância Epidemiológica/SES/SC (SPS/DIVE/SES, 2008).

Este estudo se propôs identificar um método capaz de melhorar a sensibilidade da PCR por meio da cultura (como um pré-tratamento da amostra). Esse procedimento parece melhorar a capacidade de detecção por PCR do gene alvo, uma vez que se extrai o DNA puro da micobactéria ao contrário do que ocorre com o DNA extraído diretamente do escarro que contém bactérias do trato respiratório superior e boca, fungos, leucócitos e outras células. Na experiência do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias/CCS/UFSC, tem sido observado que a partir de colônias crescidas em LJ, a PCR apresenta 100% de sensibilidade na amplificação do 16S rDNA, enquanto no escarro os valores de sensibilidade variam de 22% a 72,4%, valores esses sempre ligados à qualidade do escarro (BAZZO, 2006, BAZZO, 2004). Lucchini et al (1996) utilizaram meio líquido para avaliar a PCR em cultivos precoces e obtiveram aumento da sensibilidade; Na nossa realidade, na qual a cultura é feita em meio sólido de LJ, nosso estudo se propôs verificar a contribuição do cultivo precoce no aumento da sensibilidade da PCR com objetivo de reduzir o tempo necessário para o diagnóstico laboratorial da tuberculose em condições de rotina.

A maioria dos estudos que avaliam técnicas de biologia molecular para o diagnóstico da TB foi realizado em países industrializados, sendo que poucas séries avaliam a utilidade clínica de tais técnicas em condições de rotina. Nos países em desenvolvimento, a análise de técnicas de biologia molecular na área diagnóstica não tem sido priorizada, devido ao seu alto custo, às dificuldades técnicas e operacionais de implantação, mesmo em laboratórios de referência, e à ausência de informação acerca de sua pertinência clínica e/ou de sua relação de custo-efetividade nos diferentes cenários clínicos (KRITSKI, 2006).

6.1. Baciloscopia

No nosso estudo (Tabela 1), a baciloscopia apresentou sensibilidade de 68,57% e especificidade de 80%, em relação à cultura, considerada padrão-ouro. O valor preditivo positivo foi de 96%, entretanto o valor preditivo negativo foi de 26,67%. A baciloscopia tem uma sensibilidade que pode variar de 20% a 80% conforme diferentes estudos (BAZZO, 2006, CHAKRAVORTY et al., 2005, BRUCHFELD et al., 2000, GARAY, 2000, PERERA & ARACHCHI, 1999, ASLANZADEH et al., 1998 e HABEENZU et al., 1998). Esse método é recomendado pelo programa *Stop TB* da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006) porque, embora tenha sensibilidade variada, já foi demonstrado que se forem utilizadas três amostras há melhora da sensibilidade para valores entre 80% e 90%, mas o que provavelmente é determinante na escolha do método, além da facilidade de execução e baixo custo, é seu alto valor preditivo positivo. Ficando os outros métodos bacteriológicos (cultura) e moleculares reservados para os casos em que a baciloscopia é negativa, necessidade indicada pelo baixo valor preditivo negativo da baciloscopia. Nos próximos anos deve haver modificação nessa conduta em virtude dos desafios surgidos pelo freqüente isolamento, em humanos, de novas espécies de micobactérias até então consideradas não patogênicas ou mesmo de micobactérias do complexo, como *M. canettii* que apresentam perfil de sensibilidade aos tuberculostáticos e tuberculínicos diferente do perfil de *M. tuberculosis*, sendo para isso necessário o emprego de técnicas para isolamento, identificação de espécies e determinação do perfil de suscetibilidade (SOMOSKOVI et al., 2008, VIANA-NIERO et al., 2008).

6.2. Reações de amplificação

A figura 4 mostra o produto de PCR amplificado com iniciadores para micobactérias (MYC) de DNA extraído de amostras de escarro e de cultivos precoces. A intensidade do amplificado é diferente para cada uma das amostras e parece não estar relacionada ao número de bacilos encontrados na baciloscopia. Ivens e Goossens (1997), em um artigo de meta-análise, afirmam que alguns autores atribuem resultados divergentes em diferentes metodologias quando se utiliza uma mesma amostra por distribuição desigual de micobactérias presentes no escarro e dificuldade de perfeita homogeneização da amostra, principalmente porque as micobactérias parecem estar fortemente agrupadas em algumas amostras o que dificulta sua separação e distribuição por igual no escarro (IEVENS & GOOSSENS, 1997). Essa característica tem sido por nós observada, diariamente, nos esfregaços de baciloscopia que mesmo tendo sido preparados após forte homogeneização do escarro apresentam as micobactérias agrupadas e com distribuição irregular na lâmina.

Na figura 4, as amostras 85 e 86 são amplificação direta do escarro. Pode-se observar diferença na intensidade da amplificação entre as duas amostras, a 85 apresenta boa intensidade e a 86, baixa intensidade. Essas duas amostras tiveram baciloscopia negativa. Enquanto a 86 teve cultura positiva a 85 teve a cultura negativa. Na comparação entre essas duas amostras o produto da PCR da amostra 85 é mais intenso, embora essa amostra tenha tido cultura negativa. Essa amostra foi considerada como PCR falso-positiva porque no nosso estudo usamos como padrão-ouro a cultura. Entretanto, sabidamente todos os nossos pacientes tinham diagnóstico clínico ou laboratorial de tuberculose, o que torna o padrão-ouro adotado para o diagnóstico laboratorial questionável. Segundo Cheng et al (2005) os estudos de testes com ácidos nucleicos têm sido laboratoriais empregando os resultados da cultura como o padrão-ouro e, por isso, negligenciam a integração com as informações clínicas disponíveis para a decisão. Na realidade é mandatário considerar o grau de suspeita clínica para determinar a utilidade dos testes com ácido nucleicos (CHENG et al, 2005).

Ainda sobre a figura 4, a amostra 89 é uma amplificação com 10 dias de cultivo precoce e baciloscopia negativa e a amostra 100 é uma amplificação de alta

intensidade com 3 dias de cultivo precoce e baciloscopia com 3+. A amostra 108 é a PCR do 40º dia de cultivo que permaneceu negativa, tanto na cultura quanto na PCR, entretanto a baciloscopia apresentou 7 bacilos. E a amostra 114 é uma amplificação com 12 dias de cultivo precoce e baciloscopia negativa. Esses dados apontam que não há uma correlação entre o resultado da baciloscopia e a PCR. Provavelmente, e como já afirmado (IEVENS & GOOSSENS, 1997), por dificuldade de se obter perfeita de homogeneização dos bacilos no escarro. Além disso, Ratnam, et al (1987) mostraram que os processos de descontaminação utilizados para facilitar o isolamento de micobactérias também as matam e, que a porcentagem desses organismos mortos varia dependendo do método utilizado e da espécie de micobactéria presente na amostra. A descontaminação pode causar a perda de até 10^4 microrganismos (RATNAM et al., 1987). Na análise dos resultados das PCR negativas, não consideramos que tenha sido pela presença de inibidores, pois tivemos amplificação com iniciadores para eubactérias (ZR), conforme figura 5.

6.3. Cultura

A cultura em meio sólido, em virtude do tempo de crescimento do MTB pode positivar em até 42 dias. No nosso estudo, 5 amostras cresceram em 7 dias, 5 em 14 dias, 6 em 21 dias e 10 amostras apresentaram crescimento em cultura em 28 dias o que possibilitou o cálculo de 74,29% de sensibilidade no 28º dia de cultura (Tabela 2). Esse tempo de crescimento pode variar se a amostragem contiver apenas MTB ou se for mista, contendo micobactérias de crescimento rápido o que parece ser o caso do nosso estudo já que 10 amostras cresceram entre 7 e 14 dias de cultivo.

Wattal (2002), num artigo de revisão, analisou 7 estudos que compararam diferentes meios de cultura (entre líquidos e sólidos) em relação ao tempo de crescimento micobacteriano. Para o meio sólido de Löwenstein-Jensen, a média de crescimento foi de 26,5 dias, o que corrobora nossos resultados.

A figura 3 que mostra o crescimento bacteriano da amostra 101 que teve a PCR positiva já no escarro, 3+ na baciloscopia e tempo de crescimento em LJ de 7 dias. Entretanto, o padrão de crescimento é muito variado tendo sido verificado que o

crescimento de amostras com 3+ na baciloscopia variou entre 7 e 28 dias. Consideramos que o crescimento rápido, em até 14 dias possa ser por micobactérias outras que não o *M. tuberculosis* (MNT) de crescimento rápido (tipificação a ser feita) ou simplesmente pelo fato de que nossas amostras foram processadas em no máximo 2 horas após a coleta, resultando em menor perda das micobactérias por ação de enzimas presentes no escarro o que pode ocorrer em amostras estocadas.

6.4. Análise Estatística

O presente estudo se propõe aperfeiçoar a detecção molecular das micobactérias e, com isso, contribuir para melhoria do diagnóstico laboratorial da tuberculose em condições de rotina nas quais, na maioria dos casos, não se tem informações clínicas a respeito do paciente, por isso para a análise estatística adotamos a cultura como padrão-ouro. Entretanto, sabidamente nossas amostras são de pacientes com diagnóstico clínico e/ou laboratorial da tuberculose e as culturas negativas, se adotado diagnóstico clínico ou laboratorial como padrão-ouro apresenta resultados falso-negativos e a PCR das amostras com baciloscopia e/ou cultura negativas não deveriam ser consideradas falso-positivas.

Para a análise estatística da tabela 3, na qual é possível observar os valores de *odds ratio* (30,68) e *P* (0,0247) para o 28º dia de cultura, foi adotado como padrão-ouro a cultura de 42 dias. Sendo que esses valores se mantêm constantes até o 40º dia de cultura e apresentam significância estatística. Ao se comparar esses valores com os encontrados para o 21º dia de cultura (*odds ratio* 9,308 e *P* 0,1408) pode-se perceber como o crescimento lento do MTB influencia no tempo de diagnóstico da doença. Embora a *odds ratio* para o 21º dia seja de 9,308 o valor de *P* só mostra significância estatística a partir do 28º dia de cultura e por isso, o ponto de corte para cultura no nosso estudo é de 28 dias. Negi et al (2005) em estudo comparativo, da cultura sólida e líquida e da PCR, em 37 amostras, encontraram para o meio de cultura LJ uma sensibilidade de 48,9% e especificidade de 100% no 24º dia de cultura, valores encontrados no nosso estudo no 21º dia (NEGI et al, 2008).

Esse fato pode ser verificado na figura 8, que faz um comparativo das curvas ROC para o 21º e 28º dia de cultura. A sensibilidade para 21º e 28º dias foi 45,7% e 74,3%, respectivamente. E a especificidade foi de 100% para ambos períodos. A área da curva para o 28º dia é 0,871, valor superior ao encontrado para o 21º dia que é de 0,729. Segundo Buijtelts & Petit (2005), o crescimento micobacteriano é altamente afetado pelo processo de descontaminação da amostra, entretanto esse procedimento é muito importante, pois o escarro é uma amostra que contém uma variedade de microorganismos que podem crescer muito mais rapidamente que MTB. Outros estudos mostraram que este procedimento mata 70 a 90% dos bacilos viáveis, alterando a baixa viabilidade da amostra tanto para cultura quanto para a PCR (BUIJTELS & PETIT, 2005, IEVEN e GOOSSENS, 1997).

Os valores de sensibilidade e especificidade para as PCR realizadas a partir do DNA extraído de cultivo precoce de MTB, conforme tabela 4, indicam como ponto de corte o 17º dia de cultivo precoce seguido de PCR para detecção do DNA micobacteriano. Em relação ao ponto de corte da cultura, nosso estudo conseguiu agilizar o diagnóstico em 11 dias. Lucchini et al (1996) realizaram um estudo para a detecção precoce do *Mycobacterium tuberculosis* em cultura de meio líquido seguido de PCR. Nesse estudo, que embora tenha utilizado um grande número de amostras (475), a amostragem positiva foi pequena. Esses autores concluíram que a PCR realizada em amostras cultivadas em meio líquido após 5 dias da inoculação pode detectar mais precocemente o *Mycobacterium tuberculosis* do que a cultura isoladamente (10 a 13 dias), reforçando a importância do cultivo precoce associado a uma técnica molecular. O presente estudo, também, incluiu a cultura em meio líquido, tendo sido verificado tempo médio de crescimento de 14 dias por meio de visualização de fluorescência do cultivo em MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*), esses resultados não foram apresentados porque o cultivo em meio líquido não foi realizado em todas as amostras.

Os dados apresentados na tabela 5 mostram que a partir do 14º dia de cultivo precoce seguido de PCR a *odds ratio* (6,0) aumenta consideravelmente, mas o valor de P só mostra significância a partir do 17º dia (P 0,03). Esse P se mantém constante até o 39º dia.

A curva ROC (figura 7) para PCR após cultivo precoce de 17 dias mostra a sensibilidade de 85,7% e especificidade de 60%, além disso, a área da curva com valor de 0,729 e valor de P de 0,03 indicam significância estatística em relação ao padrão-ouro e incremento no valor de sensibilidade da PCR. Nesse caso a PCR teve sua sensibilidade muito maior aos 22% da PCR feita diretamente do escarro e superior também a PCR feita no nosso estudo da influência da qualidade da amostra de escarro sobre os resultados da PCR no qual observamos que amostras de boa qualidade apresentam 72% de sensibilidade (CHAGAS et al., 2008 artigo submetido para publicação).

A figura 8 mostra a curva ROC comparativa dos métodos utilizados, indicando a PCR feita com DNA extraído do cultivo de 17 dias como a melhor alternativa para se obter um diagnóstico de TB mais rápido. Sendo altamente recomendável sua associação às técnicas tradicionalmente empregadas nos laboratórios clínicos de saúde pública.

7. Conclusão

1. O nosso estudo se propôs avaliar a contribuição da baciloscopia no diagnóstico da tuberculose. Partindo-se da cultura como padrão-ouro, a baciloscopia apresentou, em uma única amostra, sensibilidade de 68,57% e especificidade de 80%, valor preditivo positivo de 96% e valor preditivo negativo de 26,67%, mostrando que é necessária a associação de outros testes para detecção de 100% dos casos.

2. A cultura, em nosso estudo, teve como ponto de corte o 28º dia. Porém, 28 dias ainda é tempo longo, quando se pensa no caráter emergencial do diagnóstico de uma doença transmissível como a tuberculose.

3. A PCR realizada no DNA extraído de escarro apresentou sensibilidade de 22,86% e especificidade de 60%, tendo a cultura como padrão-ouro. Esse resultado mostra que PCR no escarro não tem sensibilidade para detectar todos os casos de TB, porém a associação da PCR com o cultivo precoce elevou a sensibilidade para 85,7%.

4. A PCR do cultivo precoce pode abreviar o diagnóstico da TB para 17 dias.

5. Em decorrência dos nossos resultados sugerimos um fluxograma de diagnóstico para a rotina laboratorial com o objetivo de agilizar o diagnóstico da tuberculose.

Este trabalho mostrou que a utilização da PCR associada à cultura pode reduzir o tempo de diagnóstico para até 17 dias. Isso contribui de forma eficaz para intervenção na cadeia epidemiológica da tuberculose, visto que, entre um diagnóstico negativo por baciloscopia e positivo por cultura transcorrem, no mínimo, 30 dias.

Além disso, a detecção precoce do DNA de micobactérias possibilita mais rapidamente a identificação da espécie e conseqüentemente auxilia a decisão clínica para a escolha do esquema terapêutico para o tratamento.

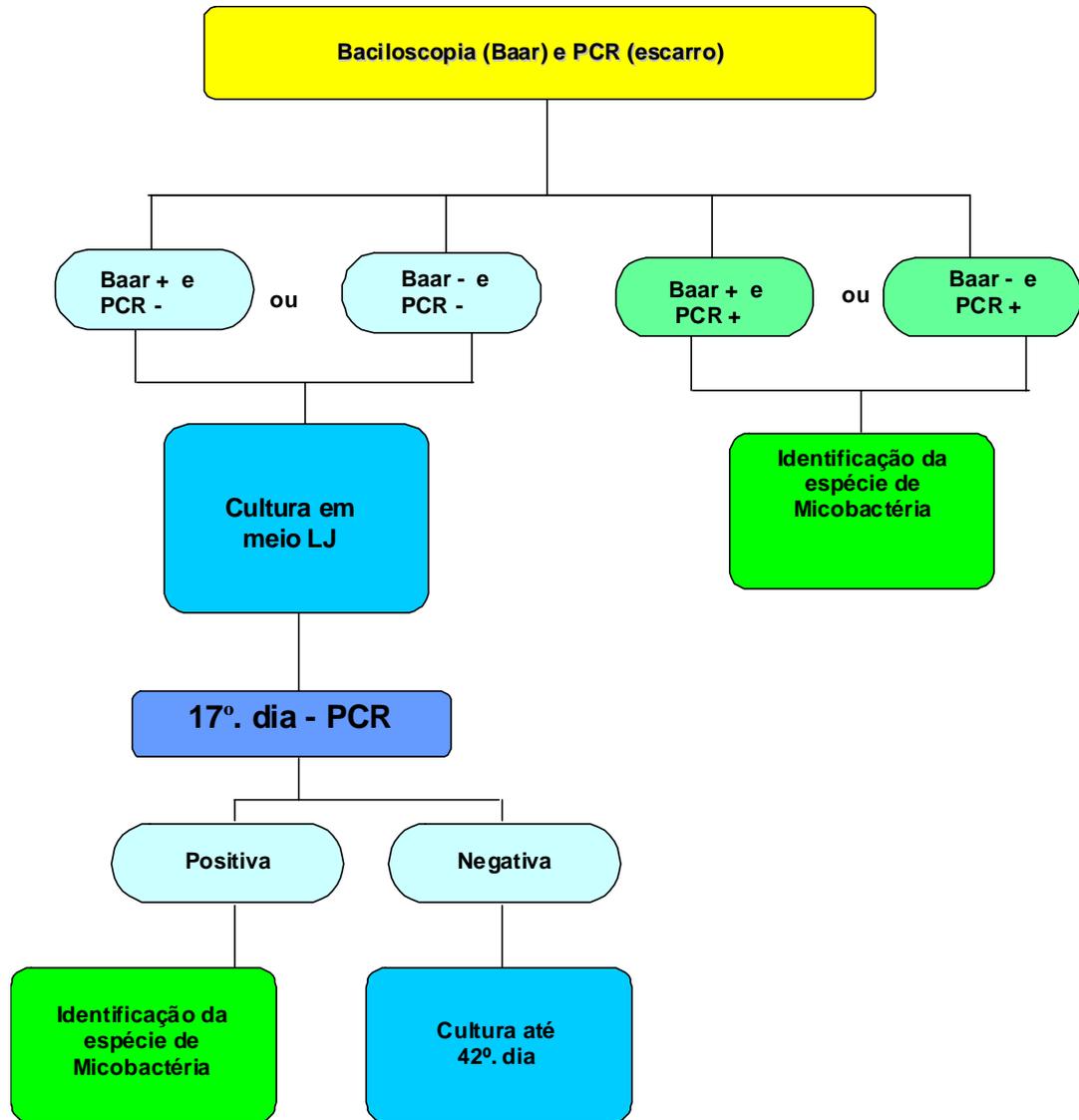


Figura 9: Sugestão de fluxograma de diagnóstico para rotina laboratorial para tuberculose

8. Perspectivas

1. Ampliar o estudo do cultivo precoce seguido de PCR utilizando amostras sem diagnóstico prévio de TB (amostras negativas e de pacientes com outras patologias) e verificar se a cultura de 17 dias seguida de PCR se aplica a todas as amostras, independente da clínica do paciente.
2. Testar outros alvos de amplificação genômica como, por exemplo, as regiões *IS6110*, *hsp65*, regiões RD, proteínas de 38 kDa para verificar se a sensibilidade da PCR melhora.
3. Oferecer ao SUS possibilidade de diagnóstico laboratorial rápido para tuberculose.

9. Referências

ASLANZADEH, J., VIUDA, M., FILLE, M., SMITH, W. B., NAMDARI, H. Comparison of culture and acid-fast bacilli stain to PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, p. 207-211, 1998.

BAZZO, M. L. Método de identificação e caracterização de micobactérias para uso em diagnóstico de rotina nos laboratórios de saúde e determinação da resistência. Tese (doutorado). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Orientador: Paulo César Peregrino Ferreira, Belo Horizonte, 135p, 2006,

BAZZO, M.L., L.A.P., FERREIRA, SILVA, R.M., SCHEFFER, M., CHAGAS, M., SEVERINO, J.L., ROVARIS, D.B., NAUCK, R., FERREIRA, P.C.P. Relação entre a Qualidade de Amostras de Escarro e o Diagnóstico de Micobacterioses por PCR. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.33, n.3, p.23-27, 2004.

BEHR, M. A., WARREN, S. A., SALAMON, H., HOPEWELL, A., PONCE DE LEON, A., DALEY, C.L. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. **Lancet**, v.353, p.444-449, 1999.

BLANCHARD, J.S. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annu. Rev. Biochem.**, v.65, p.215-239, 1996.

BLOWER SM, CHOU T. Modeling the emergence of the “hot zones”: tuberculosis and the amplification dynamics of drug resistance. **Nature Medicine**, v. 10, n.10, p.1111–1116, 2004.

BÖDDINGHAUS, B., ROGALL, T., FLORHR, T., BLOCKER, H., BOTTGER, E. C. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v.28, n.8, p.1751-59, 1990.

BRASIL. Diagnóstico da tuberculose. In: II Consenso Brasileiro de Tuberculose. Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. **J Bras Pneumo**, v. 30, n. 1, p. 6-23, 2004.

BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica - Fundação Nacional de Saúde, 5º ed. Brasília:FUNASA, 842p. Vol.II p.825, 2002.

BROWN-ELLIOTT, B. A., & WALLACE, R J. JR. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 4, p.716-746, 2002.

BRUCHFELD, J., ADERAYE, G., PALME, I. B., BJORVATN, B., KALLENIOUS, G., LINDQUIST, L.. Sputum concentration improves diagnosis of tuberculosis in a setting with a high prevalence of HIV. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 94, p.677-680, 2000.

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. **Journal of Microbiological Methods**, v. 62, p. 83-88, 2005.

CAMUS, J.C., PRYOR, M.J., MEDIGUE, C., COLE, S.T., Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Microbiology**. Great Britain, v.148, p.2967–2973, 2002

CASTELO FILHO, A., KRITSKI, A.L., BARRETO, A.W. et. al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose – Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v.30, S.1, p. S1-S85, 2004.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infectious Disease. Division of AIDS, STD, and TB Laboratory Research. Tuberculosis/ Mycobacteriology Branch. www.cdc.gov/ncidod, 2002.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infectious Disease. Division of Tuberculosis Elimination. Reported Tuberculosis in the United States, 2003. www.cdc.gov/ncidod, 2003.

CHAKRAVORTY, S., DUDEJA, M., HANIF, M, TYAGI, J. S. Utility of Universal Sample
CHENG, V. C. C., YEW, W. W., YUEN, K. Y. Molecular diagnostics in tuberculosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 24, p. 711-720, 2005.

CHENG, V. C. C.; YEW, W. W.; YUEN, K. Y. Molecular diagnostics in tuberculosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 24, p. 711-720, 2005.

CLEEFF, M. van.; 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, n. 8, p. 877-883, 2005.

COLE, S,T, BROSCHE, R., PARKHILL, J., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., GORDON, S.V., EIGLEMEIER, K., GAS, S., BARRY, C.E., TEKAIA, F., BADCOCK, K., BASHAM, D., BROWN D., CHILLINGWORTH, T; CONNOR, R., DAVIES, R., DEVLIN, K., FELTWELL, T., GENTLES, S., HAMLIN, N., HALROYD, S., HORNSBY, T., JAGELS, K., KROGH, A., MCLEAN, J., MOULE, S., MURPHY, L., OLIVER, K., OSBORNE, J., QUAIL, M.A., RAJANDREAM, M.A., ROGERS, J., RUTTER, S., SEEGER, K., SKELTON, J., SQUARES, R., SQUARES, S., SULSTON, J.E., TAYLOR, K., WHITEHEAD, S., BARRELL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, London, v.393, p.537-544, 1998.

DEAN. G. L., EDWARDS, S. G., IVES, N. J., MATTHEWS, G., FOX, E. F., NAVARATNE, L., FISHER, M., TAYLOR, G. P., MILLER, R., TAYLOR, C. B., RUITER, A., POZINAK, A. Treatment of tuberculosis in HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. **AIDS**, v.16, p. 75-83, 2002.

DJELOUADJI, Z., RAOULT, D., DAFPE, M., DRANCOURT, M. A Single-Step Sequencing Method for the Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Species. **Plos Neglect Trop Dis**, v.2, p. 1-8, 2008.

DYE, C., SCHEELE, S., DOLIN, P., PATHANIA, V., RAVIGLIONE, M. C. Global Burden of Tuberculosis: estimated Incidence, Prevalence, and Mortality by Country. **JAMA**, v. 282, p. 677-86, 1999.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W. Diagnóstico. In: Robert H. Flechter; Suzanne W. Fletcher. Epidemiologia Clínica: elementos essenciais. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 56-81.

FROTHINGHAM, R., HILLS, H. G., WILSON, K. H. Extensive DNA Sequence Conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **J Clin Microbiol**, v.32, n.7, p.1639-1643, 1994.

GARAY, J. E. Analysis of a simplified concentration sputum smear technique for pulmonary tuberculosis diagnosis in rural hospitals. **Trop. Doct.** v30, p70-72, 2000.

GORDON, S. V., HEYM, B., PARKHILL, J., BARRELL, B., COLE, S. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Microbiol**, v.145, p.881-892, 1999.

HABEENZU, C., LUBASI, D., FLEMING A F.. Improved sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum in developing countries. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 92:415-416, 1998.

HONG, S.W. Preventing Nosocomial *Mycobacterium tuberculosis* Transmission in International Settings. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.2, p.245-248, 2001.

HUGGETT, J. F.; MCHUGH, T. D.; ZUMLA, A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 1407-1412, 2003.

HUGHES, M. S., SKUCE, R. A., BECK, L. A., NEILL S. D. Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. **J. Clin. Microb.**, v.31, n.12, p.3216-22, 1993.

IEVENS, M., GOOSSENS, H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 242-256, 1997.

KRITSKI, A L. Eitorial. Avaliação da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes indígenas e não indígenas. **J Bras Pneumol**, v. 32, p. xiii-xiv, 2006.

KOH, W-J, KIM, Y. H., KWON, O. J., CHOI, Y. S., KIM, K., SHIM, Y. M., KIM, J. Surgical Treatment of Pulmonary Diseases Due to Nontuberculous Mycobacteria. **J Korean Med Sci**, v. 23, n.3, p. 397-401, 2008.

LI, Y., PETROFSKY, M., BERMUDEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* Uptake by Recipient Host Macrophages Is Influenced by Environmental Conditions in the Granuloma of the Infectious Individual and Is Associated with Impaired Production of Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor Alpha. **Infect Immun**. Washington, v.70, n.11, p.6223-6230, 2002.

LÓPEZ-MORENO, S., GARRIDO-LATORRE, F., HERNÁNDEZ-AVILA, M. **Salud Pública de México**, v.42, n.2, p.133:143, 2000.

LUCCHINI, G. M.; WEGMANN, K.; SAUER, M.; ALTWEGG, M. Early detection of *Mycobacterium tuberculosis* by culture on BBL MGIT medium followed by PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 27, p. 97-107, 1996.

MALIK, R., GABOR, L., MARTIN, P., MITCHELL, D. H., DAWSON, D. J. Subcutaneous granuloma caused by *Mycobacterium avium* complex infection in a cat. **Aust Vet J**, vol.76, n.9, p.604-607, 1998.

MATTHYS, F., PÉREZ, M. P., DÍAZ, S. V., SILVEIRA, E. G., DÍAZ, T. C., PÉREZ, L. A., OCHOA, E. G., VAN DER STUYFT, P. Diagnostic validity of an expert tuberculosis commission that assists the diagnosis of bacteriologically negative suspected TB cases in Havana, Cuba. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, n. 7, 2008.

McMURRAY, D.N. Mycobacteria and Nocardia. In: BARRON, S. Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston. 4^o ed., 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, DATASUS, Informações de Saúde. www.datasus.gov.br.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2^a ed. Rio de Janeiro: Fundação Nacional de Saúde, 115 p, 1994.

NEGI, S. S., KHAN, S. F. B., GUPTA, S. T., PASHA, S. T., KHARE, S., LAL, S. Comparison for the conventional diagnostic modalities, Bactec culture and polymerase chain reaction test for diagnosis of tuberculosis. **Indian J Med Microbiol**, v. 23, n. 1, p. 29-33, 2005.

NEONAKIS, I. K.; GITTI, Z.; KRAMBOVIITS, E.; SPANDIDOS, D. A. Molecular diagnostics tools in mycobacteriology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 1-11, 2008.

NINET, B.; MONOD, M.; EMLER, S.; PAWLOWSKI, J.; METRAL, C.; ROHNER, P.; AUCKENTHALER, R.; HIRSCHL, B. Two different 16S rRNA genes in a Mycobacterial strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 10, p. 2531-2536, 1996.

NTC – NATIONAL TUBERCULOSIS CENTER. Brief History of Tuberculosis. <http://www.umdnj.edu/~ntbcweb/history.htm>, 1996.

PERERA, J. & ARACHCHI D. M.. The optimum relative centrifugal force and centrifugation time for improved sensitivity of smear and culture for detection of Mycobacterium tuberculosis from sputum. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v93, p405-409, 1999.

PERKINS, M.D. New Diagnostic Tools for Tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis.** v.4, p.1-7, 2000.

RATNAM, S., STEAD, F.A., HOWES, M. Simplified Acetylcysteine-Alkali Digestion-Decontamination Procedure for Isolation of Mycobacteria from Clinical Specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.25, n.8, p.1428-1432, 1987.

ROGALL, T.; FLOHR, T.; BOTTGER, E. C. Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA. **J. Gen. Microb.**, v. 136, p.1915-20, 1990.

ROSSETTI, M. L. R.; SPERHACKE, R. D. Tuberculose. In: Maria Lucia Rossetti; Claudia Dornelles da Silva; Jaqueline Rodrigues. (Org.). Doenças infecciosas: Diagnóstico molecular. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, p. 47-59, 2005.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. Molecular Cloning A Laboratory Manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 3 v, 2001.

SANTOS, R. M. C.; OGUSKU, M. M.; MIRANDA, J. M.; DOS SANTOS, M. C.; SALEM, J. I. Avaliação da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes indígenas e não-indígenas. **J Bras Pneumol.**, v. 32, p. 234-240, 2006.

SARMIENTO, O. L., WEIGLE K. A., ALEXANDER, J., WEBER, D.J., MILLER, W.C. Assessment by Meta-Analyses of PCR for Diagnosis of Sear-Negative Pulmonary Tuberculosis. **J Clinic Microbiol**, v. 41, p. 3233-40, 2003.

SILVEIRA, J. M., SASSI, R. A. M., OLIVEIRA NETO, I. C., HETZEL, J. L. Prevalence of and factors related to tuberculosis in soropositive human immunodeficiency virus patients at a

reference center for treatment of human immunodeficiency virus in the southern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **J Bras Pneumology**, v.32, n.1, p.48-55, 2006.

SLOTAR, D., ESCALANTE, P., JONES, B.E. Pulmonary manifestations of HIV/Aids in the tropics. **Clin Chest Med.**, v.23, p355-367, 2002.

SMITH, I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clin Microbiol Rev.**, v. 16, p. 463-96, 2003.

SOINI, H., MUSSER, J.M. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. **Clinical Chemistry**, v.47, n.5, p. 809-814, 2001.

SOMOSKOVI, A., DORMANDY, J., MAYRER, A. R.; CARTER, M; HOOPER, N; SALFINGER, M. *Mycobacterium canettii*, isolated from an HIV-positive patient: the first case recognized in the United States. **J Clin Microbiol**, Accepts, published online ahead of print on 19 November 2008.

SOMOSKOVI, Á.; MAGYAR, P. Comparison of the mycobacterium growth indicator tube with MB redox, Löwenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1366-1369, 1999.

SPS/DVE/SES/SC - Secretaria de Políticas de Saúde – Diretoria de Vigilância Epidemiológica – Secretaria de Estado da Saúde – Santa Catarina, 2008.

TUELLER, C.; CHHJED, P. N.; BUITRAGO-TELLEZ, C.; FREI, M.; TAMM, M. Value of smear and PCR in bronchoalveolar lavage fluids in culture positive pulmonary tuberculosis. **Eur Respir J**, n. 26, p. 767- 772, 2005.

TORTOLI, E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.16, n2, p319–354, 2003.

VIANA-NIERO, C., LIMA, K. V. B., LOPES, M. L., RABELLO, M. C. S., MARSOLA, L. R., BRILHANTE, V. C. R., DURHAM, A. M., LEÃO, S. C. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in Isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **J Clin Microbiol**, v.46, n3, p. 850-855, 2008.

WALERIO-ALEIXO A.G., KROON E.G., CAMPOS M.A.S., MARGUTTI-PINTO M.E., BONJARDIM C.A., FERREIRA P.C.P. Heteroduplex Mobility Assay for Rapid, sensitive and specific Detection of Mycobacteria. **Diagn. Microbiol Infect Dis**, v.36, p.225-235, 2000.

WATTAL, C. Improving bacteriological diagnosis of tuberculosis. **Indian J Pediatr**, v. 69, p. 87-95, 2002.

WHO -WORLD HEALTH ORGANIZATION. DYE, C et. al. Progress in Global TB control. Geneva, World Health Organization, 2002. WHO -WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control. WHO Report 2004. Geneva, World Health Organization, 2004.

WHO -WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control. WHO Report 2001. Geneva, World Health Organization, 2001.

WHO -WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: surveillance, planning. Finance. WHO/CDS/2002.295. Geneva, World Health Organization, 2002.

WHO -WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Plan to Stop TB 2006 – 2015.

WHO – World Health Organization. Implementing the Stop TB strategy.A handbook for national tuberculosis control programmes. WHO/HTM/TB/2008.401. Geneva, 2008.

WOESE, C.R., Bacterial Evolution. **Microbiol Rev**, v.51, n.2, p.221-271, 1987.

WOLF, A. J., O'DONNELL, A. E. Pulmonary Manifestations of HIV Infection in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. **Chest**, v.120, n.6, p.1888-1893, 2001.

YAGER, H. Tracheobronchial secretions. **Am J Med** v. 50, p. 493-508, 1971.

10. Anexos

ANEXO 1

AMOSTRA	PCR DO ESCARRO	positividade precoce da PCR no meio sólido	CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO	BACILOSCOPIA
M85	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
M86	POSITIVA	X	21 DIAS	NEGATIVA
M87	POSITIVA	X	14 DIAS	1+
M88	POSITIVA	X	14 DIAS	2+
M89	NEGATIVA	10 dias	14 DIAS	NEGATIVA
M90	NEGATIVA	9 dias	21 DIAS	NEGATIVA
M91	NEGATIVA	6 dias	42 DIAS	2+
M92	POSITIVA	X	14 DIAS	3+
M93	NEGATIVA	1 dia	7 DIAS	3+
M94	POSITIVA	6 dias	21 DIAS	1+
M95	NEGATIVA	4 dias	42 DIAS	NEGATIVA
M96	POSITIVA	2 dias	21 DIAS	2+
M97	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
M98	NEGATIVA	11 dias	42 DIAS	1+
M99	NEGATIVA	3 dias	28 DIAS	1+
M100	NEGATIVA	3 dias	14 DIAS	3+
M101	POSITIVA	X	7 DIAS	3+
M102	NEGATIVA	14 dias	28 DIAS	3+
M103	NEGATIVA	12 dias	28 DIAS	1+
M104	NEGATIVA	14 dias	28 DIAS	SEM MATERIAL
M105	POSITIVA	X	21 DIAS	3+
M106	NEGATIVA	1 dias	21 DIAS	3+
M107	NEGATIVA	2 dias	28 DIAS	NEGATIVA
M108	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	7 BACIOS
M109	NEGATIVA	14 dias	28 DIAS	1+
M110	NEGATIVA	40 dias	40 DIAS	2+
M111	POSITIVA	X	NEGATIVA	NEGATIVA
M112	NEGATIVA	NEGATIVA	28 DIAS	3+
M113	POSITIVA	X	28 DIAS	2+
M114	NEGATIVA	12 dias	7 DIAS	NEGATIVA
M115	NEGATIVA	17 dias	28 DIAS	2+
M116	POSITIVA	X	28 DIAS	1+
M117	POSITIVA	X	NEGATIVA	NEGATIVA
M118	NEGATIVA	4 dias	7 DIAS	1+
M119	NEGATIVA	13 dias	42 DIAS	1+
M120	NEGATIVA	7 dias	42 DIAS	1+
M121	NEGATIVA	18 dias	7 DIAS	NEGATIVA
M122	NEGATIVA	15 dias	42 DIAS	NEGATIVA
M123	NEGATIVA	11 dias	42 DIAS	NEGATIVA
M124	POSITIVA	X	42 DIAS	NEGATIVA

