

MARTHA GABRIELA CELLE RIVERO

Avaliação de um teste *in house* de PCR-colorimétrico em placa para
o diagnóstico de Tuberculose Pulmonar

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARTHA GABRIELA CELLE RIVERO

Avaliação de um teste *in house* de PCR-colorimétrico em placa para o diagnóstico de Tuberculose Pulmonar

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari

Disciplina de Infectologia - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Sylvia Cardoso Leão

Disciplina de Microbiologia - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

São Paulo

2008

RIVERO, Martha Gabriela Celle

Avaliação de um teste *in house* de PCR-colorimétrico em placa para o diagnóstico de Tuberculose Pulmonar. Martha Gabriela Celle Rivero - São Paulo, 2008. xxiv, 116f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em inglês: Evaluation of microwell Colorimetric PCR in house for pulmonar tuberculosis diagnosis.

Key-words: 1.Tuberculose Pulmonar, 2. PCR colorimétrico *in house*, 3.*Mycobacterium tuberculosis*.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do curso de Pós-graduação:

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

São Paulo

2008

MARTHA GABRIELA CELLE RIVERO

Avaliação de um teste *in house* de PCR-colorimétrico em placa para o diagnóstico de Tuberculose Pulmonar

BANCA EXAMINADORA:

Titular: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari

Titular: Prof. Dr. Afranio Lineu Kritski

Titular: Dr^a. Antonia Maria de Oliveira Machado

Titular: Prof. Dr. Eduardo Alexandrino Servolo de Medeiros

Titular: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rossetti

Suplente: Prof. Dr. Katsumi Osiro

Suplente: Dr^a. Lucilene Ferrazoli

Aprovada em: 10/06/2008

DEDICATÓRIA

**À MEMÓRIA DOS MEUS PAIS MARIA MARTHA E DANIEL
AUGUSTO.**

**AO MEU ESPOSO ALBERTO, PELO APOIO,
COMPANHEIRISMO, INCENTIVO E, MAIS QUE NADA, PELO
AMOR.**

**AOS MEUS FILHOS ALBERT, TELMA, FABIOLA, RICARDO,
COMO ESTÍMULO NESSA LUTA CONSTANTE POR
ALCANÇAR NOSSOS SONHOS.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI, Professor Titular da Disciplina de Infectologia, Orientador deste trabalho, pela confiança, pelos seus ensinamentos, pelo estímulo.....muito obrigada pelo carinho e preocupação com seus alunos.

À Profa. Dr^a. SYLVIA CARDOSO LEÃO, Professora Adjunta da Disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Co-Orientadora deste trabalho; por ter-me acolhido no seu laboratório, apoiado e colaborado com muita dedicação.

Às estagiárias Luciana Cirilo e Cristiana Glicetti, e a aluna de Mestrado Fernanda Inoue do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), pela colaboração na fase da seleção das amostras.

Ana Paula Toledo da Silva e Luiza Reis responsáveis pelo setor de micobactérias da seção de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital São Paulo, pelo apoio e ajuda na coleta dos resultados.

À Dr^a. Dea Rosa Sperhacke, pelo treinamento técnico, amizade e preocupação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a Maria Lúcia Rossetti e todos seus colaboradores do Centro de Desenvolvimento de Ciências e Tecnologia-CDCT, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde-FEPPS/RS, Porto Alegre; em especial à Candice Michelon, por ter-me recebido no seu laboratório para a realização do PCR colorimétrico em placa.

À Rosana Capecce, secretária do LEMC/ALERTA, pela colaboração constante nos detalhes administrativos e sobre tudo pela grande amizade.

À minha amiga, Mirian Silva do Carmo, aluna de pós-doutorado do LEMC/ALERTA, pela revisão e ajuda na discussão deste trabalho.

A Rodrigo Cayô, querido amigo, sempre prestativo, pelo auxílio na formatação do trabalho e por suas maravilhosas sugestões.

Aos meus colegas e amigos do laboratório LEMC/ALERTA, Dra. Ana Cristina Gales, Dra. Soraya Sgambatti, Suzane Silvert, Andrea Pereira, Jussimara Monteiro, Thaís Ávila, Fernanda Marques, Paulo Bispo, Pedro D`Azevedo Liana Carballo, Itacy Siqueira, Anderson Fernandes, Adriana Nicoletti, Renata Picão, Danilo Xavier, Maria Cecília Cergole Novella, Kelly Santiago, Eloísa Campana, Alinne Guimarães, Loren Paschoal, Adryella Luz, Lorena Feldberg, Raquel Girardello, Amilton Mouro, Paula Koga, Marco Zonta, Vinícius Gomes, Bruna Teixeira, Paula Barbosa, Paula Perabo, Andréia Penteado, Juliana Gugel, Juliana Bertoli, Roberto Chiroto, Kátia Kiyota, Jéssica Sanches, Jacira Donizeti, Lilian D'Alamo.

À Renata Volpi, Agda do Carmo Vinagre, Mirella Carla Baretta, Ana Paula Veschi e Roseli Sampaio, funcionárias do Laboratório de Microbiologia do IDIPA, pelo carinho e amizade.

À Dr^a. Antonia Maria de Oliveira Machado, chefe da seção de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital São Paulo, à Eliete A. Miranda, Fernando P. Pinto, Thomas Chagas Neto, Clarice Matsumoto, Neide Ferreira Yonashiro, Lisete L.M. Pires, Elza Maria Silva e Mara Paes, pelo apoio e amizade.

À Cristina Viana Niero e Michelle Rabelo, alunas de pós graduação da Dr^a. Sylvia C. Leão, pelo auxílio.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS	xx
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Epidemiologia.....	5
2.2. Programa Nacional de Controle da Tuberculose - PNCT.....	10
2.3 - Diagnóstico	11
2.4 - Baciloscopia	12
2.5 - Cultura.....	14
2.6 - Testes Rápidos	19
2.7 - Técnicas de Biologia Molecular.....	19
3.OBJETIVOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 - Seleção de Pacientes.....	28
4.1.1 - Critérios de Inclusão	28
4.1.2 - Critérios de Exclusão	28
4.2 Parâmetros Clínicos e Epidemiológicos - Coleta de Dados	28
4.3 - Coleta e Armazenamento do Material Biológico.....	29
4.4 - Baciloscopia e Cultura.....	29

4.5 - Procedimentos Moleculares	29
4.5.1 - Extração de DNA	30
4.5.2 - Amplificação por PCR da região IS6110 de <i>M. tuberculosis</i>	31
4.5.2.1 - Detecção dos Produtos Amplificados em Gel de Agarose	32
4.5.2.2 - Detecção dos Produtos Amplificados por Colorimetria em Placa Amino Link	33
4.6 - Análise Estatística dos Dados	34
5. RESULTADOS	35
5.1 - Análise Descritiva	36
5.2 - Análise Correlacional	51
5.3 - Análise Inferencial	54
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÕES	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
9. ANEXOS	99
Anexo 1. Protocolo Clínico	100
Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UNIFESP	101
Anexo 3. Protocolo e POP do Setor de Micobactérias da Seção de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital São Paulo – HSP	102
10. APÊNDICES	104
Apêndice 1. Grupo de pacientes com diagnóstico clínico de TBP sem associação a outras doenças	105
Apêndice 2. Grupo de pacientes com diagnóstico clínico de TBP associado a outras doenças	106

Apêndice 3. Grupo de pacientes com diagnóstico clínico de TBP associado ao HIV	108
Apêndice 4. Grupo de pacientes com outros diagnósticos clínicos.....	110

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMT - Amplificação mediada por transcrição

ANP - Amostra Não Processada

BAAR - Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

EMB - Etambutol

CD4 - Linfócito TCD4

CDC - *Center for Disease Control and Prevention*

CDCT- FEPPS - Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-
Fundação de Pesquisa e Produção em Saúde

CNE - Controle Negativo de Extração

CNR - Controle Negativo de Reação

CPE - Controle Positivo de Extração

CPR - Controle Positivo de Reação

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica

DR - *Direct Repeat*

ELISA - Enzyme Linked Immune Assay

EtBr - Brometo de Etídio

EUA - Estados Unidos da América

FDA - *Food and Drug Administration*

FIND - *Foundation for Innovative New Diagnostic*

HA - Hidroxilamina

HIV - Human Immunodeficiency Virus

HSP - Hospital São Paulo

INH - Isoniazida

IS - *Insertion Sequence*

LBA - Lavado Broncoalveolar

LJ - Löwenstein-Jenssen

MAC - Complexo *Mycobacterium avium*

MGIT - *Mycobacteria Growth Indicator Tube System*®

NASBA - Amplificação baseada na seqüência de ácidos nucleicos

ODM - Objetivos de Desenvolvimento do Milênio

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PGRS - *Polymorphic Guanine-Cytosine Rich Repetitive Sequence*

PNB - Ácido p-nitrobenzóico

PNCT - Programa Nacional de Controle da Tuberculose

POP - Protocolo Operacional de Procedimentos

PZA - Pirazinamida

REDE-TB - Rede de Estudos em Tuberculose do Brasil

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIF - Rifampicina

SAME - Serviço de Arquivo Médico

SDA - Amplificação por transferência de fita

SIDA - síndrome de imunodeficiência adquirida

SM - Estreptomicina

ST - Solução Tampão

SVS - Serviço de Vigilância Sanitária

TBP - Tuberculose Pulmonar

TCH - Thiophene-2-Carboxylic Hydrazide

TE - Tampão Tris-EDTA

TMB - Tetrametilbenzidina

USA - United States of America

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Resultado da baciloscopia direta de acordo com o tipo de amostra	37
Tabela II - Resultado da PCR colorimétrica da ANP de acordo com o tipo espécime clínico.....	37
Tabela III - Resultado do método baciloscopia do sedimento de acordo com o tipo de amostra.....	38
Tabela IV - Resultado da PCR colorimétrica do sedimento de acordo com o tipo de amostra.....	39
Tabela V - Resultado da cultura de acordo com o tipo de amostra.....	39
Tabela VI - Distribuição do número de pacientes de acordo com o diagnóstico clínico.....	40
.	
Tabela VII - Resultados de baciloscopia direta da amostra de acordo com o diagnóstico clínico.....	41
Tabela VIII - Resultado da PCR colorimétrica da ANP de acordo com o diagnóstico clínico.....	42
Tabela IX - Resultado da baciloscopia do sedimento de acordo com o diagnóstico clínico.....	42
Tabela X - Resultado da PCR colorimétrica do sedimento de acordo com o diagnóstico clínico.....	43
Tabela XI - Resultado da cultura para <i>M. tuberculosis</i> , de acordo com o diagnóstico clínico	44

Tabela XII - Distribuição dos pacientes de acordo com o diagnóstico clínico, considerando a ocorrência de tratamento prévio ou não.....	44
Tabela XIII - Resultado da baciloscopia direta de acordo com o diagnóstico clínico, considerando tratamento prévio e sem tratamento.....	45
Tabela XIV - Resultado da PCR colorimétrica da ANP de acordo com o diagnóstico clínico, considerando tratamento prévio e sem tratamento.....	46
Tabela XV - Resultado da baciloscopia do sedimento, de acordo com o diagnóstico clínico, considerando ocorrência de tratamento prévio ou não.....	47
Tabela XVI - Resultado da PCR colorimétrica do sedimento de acordo com o diagnóstico clínico, considerando tratamento prévio e sem tratamento.....	48
Tabela XVII - Resultado da cultura de acordo com o diagnóstico clínico, considerando tratamento prévio e sem tratamento.....	49
Tabela XVIII - Resumo dos resultados das análises descritas.....	50
Tabela XIX - Distribuição das amostras com relação às avaliações pelos métodos de PCR colorimétrica e baciloscopia direta.....	52
Tabela XX - Distribuição das amostras com relação às avaliações pela PCR colorimétrica e baciloscopia do sedimento.....	52
Tabela XXI - Distribuição da amostra com relação às avaliações pelos métodos de PCR colorimétrica da ANP e da cultura.....	53
Tabela XXII - Distribuição da amostra com relação às avaliações pelos métodos de PCR colorimétrica do sedimento e da cultura.....	53

Tabela XXIII - Resultados do estudo de concordância entre a PCR colorimétrica da ANP e os outros testes.....	54
Tabela XXIV - Resultados do estudo de concordância entre a PCR colorimétrica do sedimento e os outros testes.....	54
Tabela XXV - Medidas de eficácia diagnóstica da PCR colorimétrica da ANP em relação à Cultura.....	55
Tabela XXVI - Medidas de eficácia diagnóstica da PCR colorimétrica do sedimento em relação à Cultura.....	55
Tabela XXVII - Resultado do estudo de concordância entre os métodos utilizados e o Diagnóstico Clínico de TBP.....	56
Tabela XXVIII - Medidas de eficácia diagnóstica dos métodos utilizados no estudo em que a Prevalência TBP foi de 23,9% (35/146).....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Forma inalatória de transmissão da tuberculose em humanos.....	6
Figura 2 - Tendência a diminuir a incidência de TB em 9 regiões do mundo.....	10
Figura 3 - Identificação de bacilos ácido-álcool resistentes pela técnica de coloração Ziehl-Neelsen.....	13
Figura 4 - Cultura de <i>M. tuberculosis</i>	15
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%).....	32
Figura 6 - Resultados da detecção colorimétrica em placas de ELISA.....	33
Figura 7 - Nomograma de Fagan.....	59

“Una antigua enfermedad aniquila hoy más gente que nunca. La tuberculosis, que muchos de nosotros pensábamos que desaparecería en nuestra época, retorna amenazadora.

Estamos ante una encrucijada...

Podemos permitir que la epidemia de TBC se vuelva más mortífera o actuamos ahora para poner fin a sufrimientos y muertes.

Estamos ante una encrucijada”.....

G. Harlem Brundtland, M.D., Director, OMS 1998

RESUMO

As técnicas mais utilizadas no diagnóstico laboratorial de rotina para tuberculose pulmonar (TBP) apresentam sensibilidade variável. Diversos testes de amplificação de ácidos nucleicos têm sido propostos para o diagnóstico rápido da tuberculose pulmonar em associação com a pesquisa de BAAR, cultura e o diagnóstico clínico. Neste estudo avaliamos o desempenho de um teste *in house* de PCR colorimétrico utilizando a seqüência IS6110 em amostras de escarro, lavado brônquio alveolar e aspirado traqueal de 150 pacientes internados com suspeita clínica de TBP em um Hospital Geral Universitário no período de março a dezembro de 2005. Foi realizada a PCR colorimétrica em amostras não processadas (ANP) e em sedimentos. A validade do teste foi estimada em comparação com a baciloscopia, cultura e diagnóstico clínico de TBP. A sensibilidade do teste *in house* PCR colorimétrico foi de 41,93% (ANP) e 48,38% (sedimento) e a especificidade de 98,21% (ANP) e 97,67% (sedimento) em comparação com a cultura. O teste *in house* PCR colorimétrico teve uma boa concordância, kappa = 0,6, em comparação com a baciloscopia e kappa = 0,5 quando comparado à cultura. Com respeito ao diagnóstico clínico a sensibilidade foi de 28,6% (ANP e sedimento) e a especificidade de 98,2% (ANP) e 97,3% (sedimento) Os valores preditivos positivo e negativo obtidos foram de 83,3% e 81,1% para ANP e de 76,9% e 81,2% para sedimento, respectivamente. O teste *in house* de PCR colorimétrico apresentou baixa sensibilidade, mas demonstrou ser altamente específico para o diagnóstico de TBP, além de apresentar boa concordância com os demais métodos utilizados na rotina laboratorial em um Hospital Geral Universitário para o diagnóstico de TBP. Em relação ao diagnóstico clínico observamos alto valor preditivo (positivo e negativo) e alta probabilidade positiva pós-teste.

ABSTRACT

The techniques most widely used in the routine laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis (PTB) show variable sensitivities. Various nucleic acids amplification tests have been proposed for the rapid diagnosis of PTB in association with the acid-fast bacillus staining, culture and clinical diagnosis. We evaluated the performance of an in-house colorimetric PCR test using the *IS6110* sequence in samples of sputum, broncho-alveolar lavage and tracheal aspirate from 150 patients with clinical suspicion of PTB admitted to a General University Hospital in the period from March to December 2005. The colorimetric PCR test was applied to non-processed samples (NPS) and to the sediment. The validity of the test was estimated in comparison with culture and clinical diagnosis of PTB. The sensitivity of the in house colorimetric PCR test was 41.93% (NPS) and 48.38% (sediment) and specificity 98.21% (NPS) and 97.67% (sediment). The in house colorimetric PCR test had a good agreement, kappa = 0.6, in comparison to the acid-fast staining and kappa = 0.5 when compared to culture. Considering the clinical diagnosis, sensitivity was 28.6% (NPS and sediment) and specificity 98.2% (NPS) and 97.3% (sediment). The positive and negative predictive values were 83.3% and 81.1% for NPS and 76.9% and 81.2% for sediment, respectively. The in house colorimetric PCR test showed low sensitivity, high specificity and good agreement compared with acid-fast bacillus staining and culture used for diagnosis of PTB in a routine microbiology laboratory at a General University Hospital. The test also showed high predictive values (positive and negative) and high positive post-test probability when the clinical diagnosis was considered.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença grave, mas o tratamento leva à cura, desde que o diagnóstico seja feito com rapidez e os medicamentos sejam tomados regularmente e de maneira adequada. O tratamento correto dos pacientes bacilíferos é prioridade do programa de controle da doença, pois permite a quebra da cadeia de transmissão (Ministério da Saúde, 1997).

O raciocínio diagnóstico da tuberculose pulmonar desenvolve-se a partir do exame clínico, dos dados epidemiológicos e da interpretação dos resultados de exames complementares. Uma forte suspeita clínica é a condição *sine qua non* para qualquer tentativa de diagnóstico precoce da tuberculose (Schluger, Kinney & Rom, 1994). Sintomas de tosse persistente, febre, dor torácica, sudorese noturna, perda de peso, inapetência e hemoptise são todos sugestivos, mas pouco específicos para a confirmação da tuberculose pulmonar. Devemos estar atentos para os grupos de pacientes em que a tuberculose é mais freqüente, que incluem pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), idosos, etilistas, pessoas vivendo ou residindo em locais onde a tuberculose é comum, contactantes de pessoas com tuberculose em atividade, pacientes com neoplasia, diabetes mellitus ou imunosuprimidos. A partir das informações obtidas com a anamnese do paciente podemos estabelecer o diagnóstico clínico-epidemiológico, e caminhar na investigação tentando sua confirmação (Wolinsky, 1994).

O exame microscópico para o diagnóstico da tuberculose pulmonar é um componente essencial do Programa de Controle da Tuberculose; já a cultura é necessária para a detecção das formas paucibacilares da tuberculose pulmonar (pacientes imunodeprimidos ou crianças) e das formas extrapulmonares. Mas ao utilizar a cultura são necessárias em torno de oito

semanas para o fornecimento do resultado final ao paciente. A realização do teste de sensibilidade às drogas ou a identificação das demais espécies do gênero aumenta esse tempo em duas semanas, e no caso de espécimes biológicos com baciloscopia negativa o tempo pode ser mais longo.

Diversos testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos de bactérias do complexo *M. tuberculosis* têm sido propostos para o diagnóstico rápido da tuberculose (alguns disponíveis comercialmente e outros *in house*). A verificação da validade desses testes é efetuada em comparação com a cultura e ou diagnóstico clínico do paciente.

O presente trabalho teve o intuito de avaliar o desempenho de um novo teste *in house* de PCR colorimétrico quando aplicado em condições de rotina laboratorial em um Hospital Geral Universitário, estimando a sua validade com respeito ao diagnóstico clínico de tuberculose pulmonar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Historicamente a tuberculose constitui inusitado fenômeno de interpenetração cultural com diversas formas da manifestação humana, por ter vitimado cientistas, literatos, poetas, músicos, pintores e monarcas, interferindo inclusive no curso político de países. Na época anterior à moderna quimioterapia os tratamentos foram bizarros, danosos, bárbaros, românticos e eróticos. O pneumotórax foi o primeiro tratamento racional. Nos sanatórios, os dramas dos doentes, os internamentos por longos anos despersonalizavam os pacientes, criando-se o denominado "Hominis Sanatorialis". Após a descoberta do bacilo por Koch, criaram-se a histeria contra o escarro e ambiente propício ao charlatanismo. Nas estâncias climatéricas, havia aspectos peculiares de assimilação dos tísicos e paralelamente o desencadeamento de quadros dantescos, de miséria dos doentes amontoados em verdadeiras mansardas.

Os tisiólogos dessa época foram heróis idealistas e humanitários, ajudando os pacientes e lutando contra a doença praticamente de mãos vazias.

*O apogeu da integração da tuberculose no romantismo, dos dramas e dos lirismos de tuberculosos célebres ocorreu no século 19 e primeira metade do século 20, contrastando com a imensa massa humana anônima dizimada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, cujos sofrimentos permaneceram ignorados restando apenas frios números estatísticos (Rosemberg, 1999).*

2.1. Epidemiologia

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas já descritas, sendo que existem relatos de lesões tuberculosas observadas em esqueletos datados de 2000 anos a.C. (Arriaza *et al.*, 1995). *Mycobacterium tuberculosis*, o agente

etiológico da tuberculose, foi isolado e cultivado em 1882, pelo médico alemão Robert Koch e chamado desde então de bacilo de Koch.

Apesar de antiga, esta doença possui mecanismos imunopatogênicos pouco conhecidos. Sabe-se que a bactéria é um patógeno intracelular facultativo, que pode sobreviver e reproduzir-se dentro de células fagocitárias, especialmente nos macrófagos. No trato respiratório, os microrganismos inalados (Figura 1) são apreendidos no muco, transportados para a parte posterior da orofaringe pela ação ciliar e, finalmente, eliminados na maioria dos casos. No entanto, alguns microrganismos podem atingir os alvéolos e então ser fagocitados por macrófagos locais.

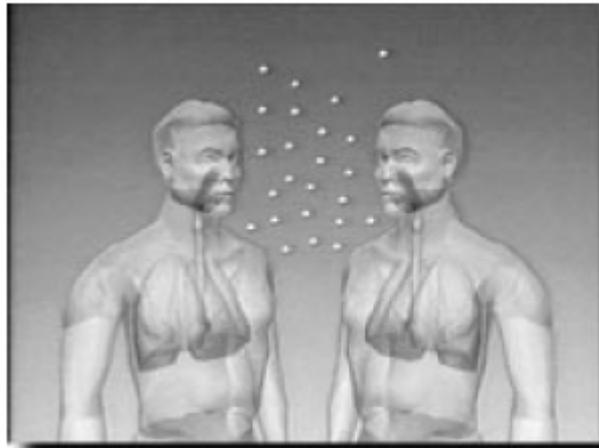


Figura 1. Forma inalatória de transmissão da tuberculose em humanos (Adaptado do Programa para Capacitación de Laboratórios, México 2000).

Cerca de 10% dos indivíduos infectados com tuberculose desenvolvem a doença ativa ao longo da vida, o restante mantém o bacilo sob a forma latente (Comstock, 1982; Kato-Maeda *et al.*, 2001). Fatores como a baixa resistência do hospedeiro, o grande número de bactérias, o grau de ativação dos

macrófagos alveolares, e a presença de proteínas e glicolípídeos localizados na parede bacteriana expressos pela micobactéria causam condições para a doença progredir.

O bacilo da TB mata mais indivíduos que qualquer outro agente infeccioso sozinho. Os óbitos representam 25% de toda a mortalidade evitável nos países em desenvolvimento, onde se registram 95% dos casos e 98% dos falecimentos causados pela doença. A maioria dos casos (75%) ocorre no grupo etário economicamente produtivo (15-50 anos) e é a principal causa de morte por infecção de mulheres jovens. Assim, fatores sociais como condições precárias de alimentação, transporte, educação, moradia (por exemplo, aglomerados populacionais), síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), movimentos migratórios, envelhecimento da população e a piora na qualidade dos programas de controle de TB sob a coordenação dos gestores públicos condicionam à maior predisposição para a infecção (WHO, 2002).

A taxa de mortalidade da tuberculose associada à SIDA é superior àquela observada na tuberculose isoladamente, independente da contagem de linfócitos CD4⁺ (Whalen *et al.*, 1995). Como consequência, temos pessoas com infecção prolongada, sofrendo, morrendo e colocando em risco a população, os profissionais da saúde e outros pacientes. Jones e colaboradores (1993) descreveram uma relação entre o grau de imunodeficiência, avaliado pela contagem de CD4⁺, e a apresentação clínica e radiológica da tuberculose. A presença de tuberculose extrapulmonar foi mais freqüente nos pacientes com contagem de CD4⁺ menor que 100 células/mm³. Em geral, pacientes com contagem de CD4⁺ maior que 200 células/mm³ apresentaram doença com padrão da tuberculose “clássica” do adulto ou pós-primária, enquanto naqueles

com contagem menor a apresentação foi “atípica” para adultos, ou típica da doença primária, tal qual ocorre nos casos pediátricos.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que em 2006 houve 14,4 milhões de casos prevalentes de Tuberculose Pulmonar (TBP) e 1,7 milhões de óbitos, sendo que 0,2 milhões correspondiam ao grupo de pacientes infectados pelo HIV. Em 2007, 202 de 212 países notificaram 5,1 milhões de casos novos, dos quais 2,5 milhões eram casos bacilíferos novos. Do total, 83% dos casos foram diagnosticados nas regiões da África, Ásia Sul-oriental e Pacífico Ocidental (WHO, 2008).

O Brasil ocupa o 16º lugar na lista dos 22 países onde se estima que ocorram 80% dos casos de TB do mundo. Estima-se uma incidência de 60/100.000 hab/ano, dos quais são notificados apenas cerca de 90 mil casos, em sua maioria em grandes centros urbanos. O coeficiente de mortalidade, em 2006, foi de 7,8/100.000 /hab/ano; o percentual de detecção de casos foi igual a 67% e o de curas, 72% (Duarte, 2006). O Estado de São Paulo anualmente notifica cerca de 21.000 casos, representando em números absolutos o maior contingente de casos do Brasil. No entanto, o coeficiente de incidência de casos do Estado situa-se próximo da média nacional de 44,1 por 100.000 habitantes em 2004. O coeficiente de incidência do Estado foi de 43,9 casos por 100.000 hab/ano e o coeficiente de incidência de pacientes bacilíferos de 22,5 casos por 100.000 hab/ano (SVS, 2005). No Rio Grande do Sul observou-se associação entre fatores de risco, apresentados por cerca de 40% dos casos, e características demográficas e clínico-laboratoriais, obedecendo ao padrão descrito para regiões em desenvolvimento (Mattos *et al.*, 2006).

O percentual de abandono do tratamento está em torno de 12% no País, chegando, em algumas capitais, ao valor de 30 a 40%, o que demonstra elevadas taxas de não aderência ao tratamento. A avaliação do perfil de resistência aos medicamentos anti-TB é realizada em menos de 5% dos casos diagnosticados. Os fatores limitantes para o controle efetivo da TB estão relacionados à baixa efetividade de atuação dos serviços de saúde em prevenção, diagnóstico, tratamento e a má qualidade dos mesmos. Somado a isso, de um lado, há a ausência da sociedade civil como parceira no monitoramento das ações governamentais, e de outro, a escassez de conhecimentos básicos da biologia do bacilo e da relação parasito-hospedeiro, que poderiam fornecer novos alvos de intervenção para o controle da TB, como novas vacinas, novos fármacos e novos métodos diagnósticos.

A OMS espera que as taxas de prevalência e mortalidade por TB publicadas em 1990 (Figura 2a) sejam reduzidas até o 2015 (Figura 2b), meta que está incluída no ODM6 dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) como programa de controle à tuberculose (WHO, 2008).

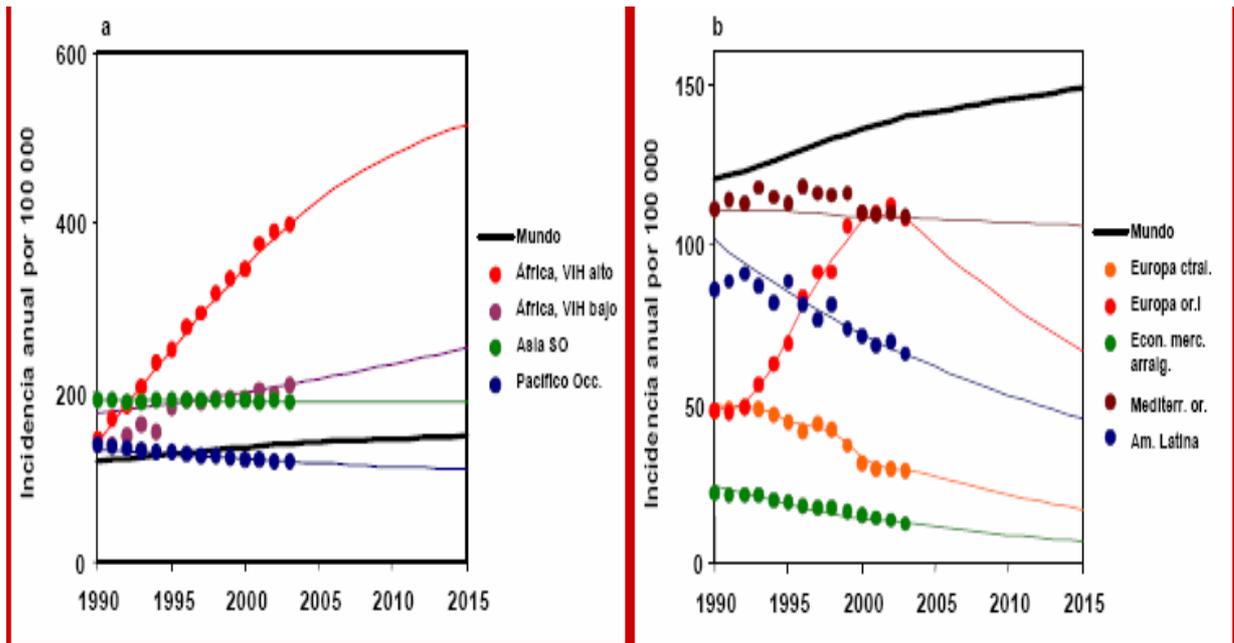


Figura 2. Tendência a diminuir a incidência de TB em 9 regiões do mundo*

(*Stop TB Working Group, 2008*). * Gráfico publicado por WHO, 2002.

2.2. Programa Nacional de Controle da Tuberculose - PNCT

Atualmente, a prevenção da TB é feita com a vacina BCG, que é a mais utilizada entre todas as vacinas disponíveis. Entretanto, sua efetividade é extremamente controversa por variar entre 0% e 80% e apresentar pouco impacto nos indicadores epidemiológicos da TB nos adultos, em âmbito mundial (SVS,2002). Torna-se imperioso, portanto, o desenvolvimento de novas vacinas à luz da tecnologia pós-genoma.

O PNCT tem como propósito fundamental promover o controle da TB no Brasil. Busca a interrupção da transmissão da doença e a conseqüente diminuição dos riscos de adoecer e morrer por ela. Para isso, procura identificar de maneira oportuna todos os doentes de TB, e principalmente os da forma pulmonar bacilífera (principais transmissores da doença), garantindo seu tratamento até o final.

Toda a população brasileira tem direito ao diagnóstico e tratamento gratuitos no Sistema Único de Saúde. A maioria dos casos ocorre em pacientes do sexo masculino e em idade produtiva, prejudicando ainda mais as condições de vida das famílias carentes, maiores vítimas da TB. A pobreza gera a tuberculose, que gera mais pobreza (http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21446).

2.3 - Diagnóstico

O diagnóstico clínico precoce da doença é bastante complicado, sobretudo quando a TB está associada a outras enfermidades (infecção pelo HIV, neoplasias malignas, pós-transplante, etc), quando então o diagnóstico laboratorial é de extrema importância. Entre os métodos utilizados no diagnóstico da TB podemos citar os métodos bacteriológicos (baciloscopia e cultura; métodos de detecção do crescimento micobacteriano, automatizados ou não); testes imunossorológicos; prova tuberculínica; métodos radiológicos e métodos de biologia molecular (Katoch, 2004).

Nos pacientes em que há uma suspeita clínica de TB, o primeiro passo na investigação deve ser uma combinação de exame radiográfico de tórax e pesquisa de micobactérias no escarro. Apesar de algumas apresentações radiológicas serem sugestivas de TB pós-primária (velamento nos segmentos apicais e posteriores do lobo superior, com ou sem cavitações), as manifestações radiológicas da TB são geralmente muito variadas, incluindo cavitações, infiltrados alveolares, intersticiais, nodulação miliar e derrame pleural. A apresentação radiológica da tuberculose pode variar mais ainda nos pacientes infectados pelo HIV. Fraser e colaboradores (1991) descreveram 17

padrões radiológicos possíveis para as doenças pulmonares. A tuberculose pode manifestar-se radiologicamente, através de 12 desses padrões, o que dá a idéia da pouca especificidade do exame radiológico convencional para confirmação diagnóstica. O padrão radiológico da TBP, normalmente variável, sofre a influência dos diferentes graus de imunodeficiência impostos pela co-infecção do HIV e na TBP da criança (Brasil, 1995; Kritski *et al.*, 2000). Pitchenik & Rubinson (1985) em estudo comparativo e representativo de pacientes com SIDA em fase avançada, mostraram que 60% destes tinham adenopatia hilar ou mediastinal, 29% apresentavam infiltrados localizados nos terços médios e inferiores dos pulmões e 12% apresentaram exame radiológico de tórax normal. No grupo de pacientes sem SIDA, a freqüência destes achados foi de 3%, 3% e 0%, respectivamente. Além disso, enquanto 67% dos pacientes sem SIDA apresentaram cavidades pulmonares, nenhum dos pacientes com SIDA apresentou essa alteração. Somente 18% dos pacientes com SIDA apresentaram velamento apical, comparados com 97% do grupo sem SIDA.

O diagnóstico clínico definitivo e a identificação do microrganismo causador da infecção a partir de amostras clínicas iniciam-se com a análise das amostras de escarro para identificação de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) que apresenta sensibilidade em torno de 50% (Figura 3) (Chakravorty *et al.*, 2005).

2.4 - Baciloscopia

“O método bacteriológico é o recurso mais importante para o diagnóstico e controle de tratamento da tuberculose, pois permite a detecção do agente

etiológico por meio da baciloscopia e/ou da cultura” (Ministério da Saúde, 1994).

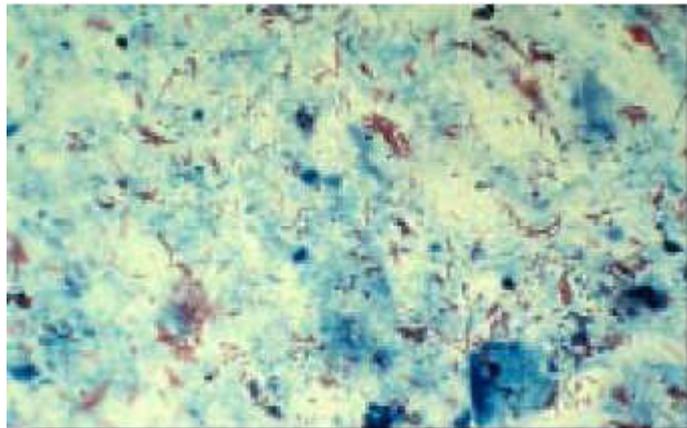


Figura 3. Identificação de bacilos ácido-álcool resistentes pela técnica de coloração Ziehl-Neelsen (Adaptado do Programa para Capacitación de Laboratórios, México 2000).

A baciloscopia fundamenta-se na propriedade conhecida como álcool-ácido resistência. Por causa da grande quantidade de lipídeos na parede celular das micobactérias, esta, após ser corada com carbolfucsina, não perde a coloração sob a ação de álcool-ácido (Wayne & Kubica, 1986).

Este exame é apenas presuntivo, pois permite a visualização dos BAAR presente no espécime em quantidade igual ou superior a 10^4 bacilos/mL, mas não a sua identificação. É efetuado nos esfregaços dos espécimes (direto ou sedimento) em lâminas que depois de secos e fixados são corados pelos métodos de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun. Em alguns laboratórios, adota-se também o método com Auramina-O. Quando são utilizados os dois primeiros métodos, a leitura é realizada em microscópio óptico comum usando objetiva de imersão. Quando os esfregaços são corados com Auramina-O, são

examinados em microscópio de fluorescência com objetiva 40X (Martins, 2000).

A baciloscopia é considerada o exame básico para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, sendo indicada para pesquisa direta do bacilo no escarro, por ser um método simples, de fácil implantação e de baixo custo. No caso de outros tipos de espécimes, há necessidade de cautela ao avaliar resultados de baciloscopia, pois micobactérias saprofitas podem estar presentes transitoriamente (Martins, 2000).

Na execução do exame bacteriológico, são importantes tanto a qualidade como o transporte e conservação adequados do espécime, assim como o uso de técnicas laboratoriais precisas. Diversos espécimes biológicos podem ser analisados para detecção de *M. tuberculosis* e de outras espécies de micobactérias e são divididos em:

- a) originalmente não estéreis (em razão da presença de flora bacteriana) como escarro, lavado brônquico, lavado gástrico, secreções em geral, fezes, urina, biópsias de pele;
- b) originalmente estéreis como sangue, gânglio, secreção de gânglio, biópsia de tecido interno e líquidos pleural, ascítico, sinovial, cefalorraquidiano (Ministério da Saúde, 1994).

2.5 - Cultura

Muitos métodos de cultura, seletivos ou não, estão disponíveis para detecção e isolamento de micobactérias (Figura 4). Os meios não seletivos podem ser caldos e meios sólidos com base de ovo ou com base de ágar (Nolte & Metchock, 1995).

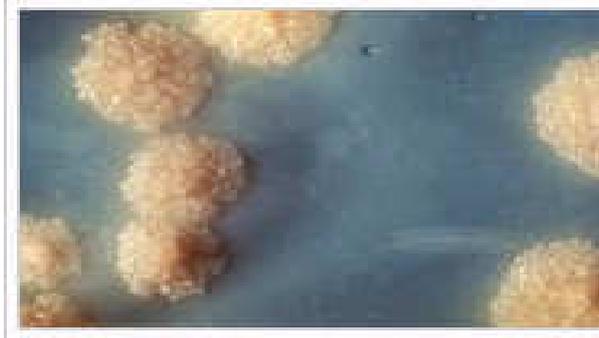


Figura 4. Cultura de *M. tuberculosis* (Adaptado do Programa para Capacitación de Laboratórios, México 2000).

Os caldos mais utilizados são o de Middlebrook 7H9 e Dubos *Tween* albumina. Atualmente o meio líquido Middlebrook 7H9 é o mais utilizado nos sistemas semi automatizados ou automatizados e é também utilizado no BBL *Mycobacteria Growth Indicator Tube System*® (MGIT) (Becton-Dickinson) (Hanna *et al.*, 1999).

O meio sólido com base de ovo mais utilizado é o de Löwenstein-Jensen (LJ); o de Petragnani tem uma concentração de verde malaquita maior que o LJ, e é mais adequado para inoculação de amostras mais contaminadas. Os meios com base de ágar são mais indicados para detecção precoce de colônias microscópicas sendo possível detectá-las de 10-12 dias após a semeadura (Nolte & Metchock, 1995; Mejia *et al.*, 1999; Palomino & Portales, 2000).

Uma desvantagem dos meios com base de ágar em relação ao meio LJ é a sua durabilidade, após seu preparo, que é no máximo de um mês sob refrigeração. A exposição à luz poderá resultar em deterioração com produção

de formaldeídos, que são tóxicos para as micobactérias (Miliner, Stottmeier & Kubica, 1969).

O método radiométrico BACTEC TB 460 (Beckton Dickinson Microbiology System) usa meio líquido contendo ácido palmítico marcado com ^{14}C (Bloom, 1994). O crescimento pode ser detectado em 7 a 15 dias pela mensuração de $^{14}\text{CO}_2$. O método BACTEC-MGIT 960, comercializado pela mesma empresa, não usa material radioativo e a detecção do crescimento é feita utilizando fluorometria (Hanna *et al.*, 1999; Somoskovi *et al.*, 2003). Ambos os métodos dependem de aparelhos importados e são de alto custo.

O isolamento da bactéria em cultura possibilita o uso de provas bioquímicas para identificação das espécies de micobactérias e a realização de testes de susceptibilidade *in vitro* para verificação da resistência da cepa de *M. tuberculosis* aos tuberculostáticos. A cultura requer de 4-6 semanas devido ao crescimento lento das micobactérias. Dessa forma a determinação da susceptibilidade às drogas requer de 3-6 semanas adicionais levando a atraso na emissão do resultado final.

O *International Working Group on Micobacterial Taxonomy* (IWGMT) em 1974-1976, aceitou 11 testes altamente reprodutíveis para o uso em estudos de sistemática do gênero *Mycobacterium* e também utilizados nos laboratórios de Saúde Pública para identificação de espécies (Wayne *et al.*, 1974; Wayne *et al.*, 1976). Os testes mínimos para identificação de micobactérias são: crescimento a 25°C, 30°C, 33°C, 37°C, 42°C e 45°C, análise da presença de pigmentação, resistência a isoniazida (INH) (2 e 20 µg/mL), hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) (2 µg/mL), hidroxilamina (HA) (500 µg/mL), ácido p-nitrobenzóico (PNB) (500 µg/mL, cloreto de sódio (CINa) (5%), tiacetazona (20

µg/ml), ácido pícrico (0,2%) e ácido oleico (250 µg/ml) teste de catalase, hidrólise do Tween, urease, produção de niacina, redução de nitrato, fosfatase ácida, arilsulfatase, pirazinamidase e atividade da esterase.

No Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz as cepas recebidas do Estado de São Paulo são submetidas aos testes de susceptibilidade e identificação da espécie. Os aspectos macroscópicos e microscópicos da cultura são considerados para direcionamento das cepas aos testes adequados, por exemplo, uma cultura com colônias rugosas, acromógenas e com bacilos formando cordas à microscopia é presuntiva de *M. tuberculosis* e, portanto, o isolado é submetido a testes de susceptibilidade às drogas. São utilizados PNB, TCH, INH, Rifampicina (RIF), Etambutol (EMB), Estreptomicina (SM) e Pirazinamida (PZA). A espécie *M. tuberculosis* é susceptível ao PNB e resistente ao TCH, e com exceção dos casos resistentes, apresenta susceptibilidade a EMB, RIF, SM, PZA e INH.

As culturas resistentes a TCH e PNB são submetidas a testes para identificação de micobactérias não tuberculosas (Chimara *et al.*, 2008). Os testes bioquímicos são feitos com as bactérias de cultivos frescos e as condições de realização são importantes para que os resultados sejam confiáveis e reprodutíveis, pois os mesmos variam de acordo com a concentração do substrato, tempo de reação, composição do tampão, comprimento de onda selecionado para detectar a reação, reagentes colorimétricos, etc.

As técnicas são tradicionais e, portanto, já não se questiona o custo e benefício de sua aplicação rotineira, porém existem algumas desvantagens. A identificação requer a sementeira da micobactéria em diversos meios para

provas de pigmentação e de crescimento em diversas temperaturas, para pesquisa de susceptibilidade a determinadas drogas e para verificação da utilização de substratos químicos. Para a interpretação do crescimento da micobactéria em meios com drogas, é necessário um treinamento prolongado e, mesmo assim, em alguns casos pode ser subjetiva. Vários testes para identificação de uma espécie são necessários, o que dificulta a implantação da técnica em laboratórios regionais. A realização dos testes baseados na expressão de certas características bacterianas que podem ser variáveis requer o crescimento abundante da micobactéria em cultura, o que leva em torno de uma a quatro semanas. A leitura é feita depois de três semanas da semeadura nos meios específicos, sendo, portanto, requerido um longo tempo para obtenção do resultado (Martins, 2000).

Na última década, a utilização destes testes tem sido questionada, pois no momento atual é importante a identificação rápida da espécie micobacteriana para orientar o tratamento, e esses testes só fornecem a identificação após três a oito semanas (Kusunoki *et al.*, 1991; CDC, 1996; Shikama *et al.*, 1999).

Springer e colaboradores (1996) mencionaram que os métodos fenotípicos não são capazes de separar espécies muito similares como as do Complexo *Micobacterium avium* (MAC) que contém pelo menos quatro espécies e é citado por Guerrero e colaboradores (1995) como a “zona cinzenta” da taxonomia da micobactérias e por Kirschner & Böttger (1992) como a “dor de cabeça” dos taxonomistas, porque obscurece a interpretação de estudos médicos e veterinários de infecções causadas por *M. avium*.

2.6 - Testes Rápidos

Testes imuno-sorológicos para detecção rápida de TB ativa têm sido propostos, como hemaglutinação, fluorescência direta, radioimunoensaio e ELISA, mas até o momento não se mostraram úteis do ponto de vista clínico (Daniel *et al.*, 1987; Alzahrani *et al.*, 2000; Conde *et al.*, 2000).

A prova tuberculínica é usada ainda hoje como método auxiliar no diagnóstico da TB, mas, estima-se uma taxa de 25% de resultados falso-negativos em pessoas com tuberculose ativa (Holden *et al.*, 1971).

2.7 - Técnicas de Biologia Molecular

Os avanços técnico-científicos, nas últimas décadas, deram origem a vários testes diagnósticos promissores. No entanto, houve muito pouco progresso no entendimento de como operacionalizar tais técnicas em condições de rotina nos Serviços de Saúde, bem como avaliar seu impacto em termos de custo-efetividade no controle da TB de maneira global.

Partindo-se do pressuposto de que o genoma de qualquer organismo é o que de mais específico existe para sua identificação, técnicas de biologia molecular, especialmente as técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucléicos, passaram a ser utilizadas para o diagnóstico de diversas doenças, inclusive para TB, com a vantagem de poderem oferecer o resultado em tempo muito curto (algumas horas). Os métodos de diagnóstico de TB baseados em amplificação de ácidos nucléicos são:

- i) Reação em cadeia da polimerase (PCR)
- ii) Amplificação mediada por transcrição (AMT)
- iii) Amplificação baseada na seqüência de ácidos nucléicos (NASBA)

- iv) Amplificação por transferência de fita (SDA).
- v) Amplificação Q β replicase

O primeiro desafio para a utilização destas técnicas foi identificar seqüências de DNA que poderiam não só separar as micobactérias de outras bactérias patogênicas, mas que pudessem distinguir entre espécies de micobactérias. Muitos alvos do genoma das micobactérias foram identificados, dentre eles podemos citar os genes que codificam as proteínas de 32 kDa (Soini *et al.*, 1992), 38 kDa (Miyazaki *et al.*, 1993), 65 kDa (Brissoa-Nöel *et al.*, 1989) e os genes *dnaJ* (Takewaki *et al.*, 1993) e *mtp40* (Parra *et al.*, 1991). Alguns destes genes são gênero ou complexo específicos, e para identificação das espécies seria necessária a realização de hibridação ou uso de enzimas de restrição.

O alvo mais freqüentemente utilizado para diagnóstico molecular é a seqüência de DNA denominada IS6110, seqüência que tem significado funcional desconhecido, capaz de auto replicação e que pode estar permanentemente integrada ao genoma do hospedeiro (Eisenach *et al.*, 1990).

A IS6110 consiste em uma seqüência de 1.355 pares de bases (pb) contendo 28 pb idênticos, mas com seqüência invertida em ambas as extremidades e é encontrada exclusivamente em cepas pertence ao complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*) (Thierry *et al.*, 1990).

Durante as últimas décadas, têm sido desenvolvidos vários métodos de detecção direta e identificação de *M. tuberculosis* a partir de amostras clínicas. Esses métodos são capazes de reduzir o tempo de diagnóstico de semanas para dias, tendo assim uma grande relevância nos laboratórios de diagnóstico.

Os testes comerciais com reagentes padronizados são submetidos à aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA-USA), para que possam ser usados para diagnóstico e ao estarem disponíveis comercialmente simplificam a utilização das técnicas moleculares, possibilitando maior reprodutibilidade de resultado.

Os testes disponíveis comercialmente até o momento são AMTD[®] e EMTD[®] (Gen-Probe Inc., San Diego, CA), Amplicor[®] e Cobas Amplicor[®] (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ), o último de uma geração com automatização completa, e SDA[®] (Biosciences, Sparks, Md). Entretanto, apenas o AMTD[®], o Amplicor[®] e o EMTD[®] foram aprovados pelo FDA, e exclusivamente para amostras respiratórias, com baciloscopia positiva. Cabe ressaltar que o EMTD[®] foi aprovado para amostras com baciloscopia negativa também. Todos esses testes foram aprovados para uso em casos com suspeita clínica de TB pulmonar em pacientes adultos, não infectados pelo HIV e sem tratamento prévio nos 12 meses que antecederam o evento atual (Mello *et al.*, 2002).

Dependendo do “padrão ouro” considerado, estudos mostram que a sensibilidade do PCR varia entre 77% e 95% e a especificidade é maior que 95% em amostras com baciloscopia positiva (Kivihya-Ndugga *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2005).

Segundo o *Center for Disease Control and Prevention* - CDC (1996), os testes de amplificação preparados em laboratório (*in house*) devem ser utilizados para o diagnóstico com muito critério, pois as variáveis são inúmeras, o que dificulta sua avaliação. A padronização da técnica, principalmente da extração do DNA, é fundamental no sucesso dos testes *in house*. Rossetti e

colaboradores (1997) padronizaram um método de extração de DNA a partir de amostras clínicas, utilizando sílica. O método foi utilizado por outros autores que comprovaram sua eficácia para a remoção de possíveis inibidores da Taq DNA polimerase presentes no sangue, escarro e outros materiais biológicos (Al-Soud, 2000; Almeda *et al.*, 2000; Boddinhaus, 2001). Por outro lado, a acuidade da PCR depende da seqüência alvo escolhida e da realização do teste em cepas isoladas ou em amostras clínicas. Ogusku e colaboradores, em 2004, selecionaram amostras clínicas de pacientes com suspeita de TBP no estado de Amazonas e aplicaram a técnica de PCR utilizando *primers* específicos para os seguintes alvos: IS6110 e genes codificadores das proteínas 65 kDa, 38 kDa e MPB64 e concluíram que o protocolo utilizado no processamento das amostras clínicas e os *primers* específicos utilizados para amplificação do fragmento de 123pb da seqüência IS6110 demonstraram maior eficiência no diagnóstico de tuberculose pulmonar paucibacilar. Bollela e colaboradores (1999) utilizaram os mesmos *primers* complementares à seqüência IS6110 no trabalho realizado em 1999, com o intuito de padronizar uma reação que pudesse ser realizada (*in house*) de maneira simplificada e que fosse facilmente reproduzida em laboratórios com recursos mínimos para a realização do teste.

A PCR é capaz de detectar até uma cópia de um fragmento de DNA de *M. tuberculosis*, como já foi demonstrado por Eisenach e colaboradores (1990). Bollela (2000) detectou até 3 bacilos em uma solução-padrão o que confirma a extrema sensibilidade da técnica em amplificar seqüências genômicas de *M. tuberculosis*.

Sperhacke e colaboradores (2004) no estudo de padronização de um método de diagnóstico colorimétrico para TB incluíram controles negativos de extração e amplificação, os quais foram processados com as amostras clínicas, como sugerido por Noordhoek e colaboradores (1996) bem como a utilização de procedimento operacional padrão (POP), que possibilita uma melhor performance dos técnicos e uma confiável avaliação do controle de qualidade dos métodos que utilizam a amplificação de ácidos nucleicos.

Existe variação da acurácia entre os diferentes laboratórios que utilizam métodos *in house*, e alguns estudos indicam que resultados falso-negativos ocorrem na etapa de detecção e não durante a reação da PCR (Suzuki *et al.*, 1992). Vários métodos de detecção têm sido relatados; os mais usuais envolvem a eletroforese em gel de agarose utilizando brometo de etídio ou visualização dos produtos amplificados usando sondas radioativas. Mais recentemente têm sido utilizados métodos onde o DNA amplificado é detectado em fase sólida com sistemas não radioativos. Sperhacke e colaboradores (2003) padronizaram uma metodologia de PCR *in house* com detecção colorimétrica usando suporte sólido.

Apesar da elevada sensibilidade e especificidade das metodologias moleculares, a análise de custo e real contribuição na prática clínica merece um especial destaque. Os custos atuais de ensaios comerciais de amplificação de ácidos nucleicos impossibilitam a inclusão destes no diagnóstico de rotina. Os países pobres são mais sobrecarregados com os mais elevados números de casos e, portanto, é pouco provável que se beneficiem de tecnologias caras. Percebendo isso, agências como a *Foundation for Innovative New Diagnostic* (FIND), a OMS e a *Stop TB Working Group for New Diagnostic* incentivam as

iniciativas de criar e implementar novas tecnológicas acessíveis e disponíveis em países em desenvolvimento, para detectar a TB e outras doenças negligenciadas (Ling *et al.*, 2008).

Em 2001 o custo do teste de amplificação de ácidos nucléicos era de aproximadamente US\$50 a US\$100 (Schluger *et al.*, 2001). O custo do método desenvolvido por Sperhackle e colaboradores em 2003 foi estimado em aproximadamente US\$10 para o processamento de 14 amostras clínicas, sem considerar outros custos não relacionados à execução do teste molecular. O tempo requerido para o procedimento foi de aproximadamente 8 horas.

3.OBJETIVOS

- Avaliar o desempenho do teste *in house* de PCR colorimétrico no diagnóstico de tuberculose pulmonar quando aplicado em condições de rotina laboratorial em um Hospital Geral Universitário;
- Estimar a validade do teste com respeito ao diagnóstico clínico de tuberculose pulmonar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Seleção de Pacientes

4.1.1 - Critérios de Inclusão

Todos os pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar que estiveram internados em diferentes unidades do Hospital São Paulo (HSP) e com amostras (escarro, lavado bronco-alveolar, aspirado traqueal e líquido pleural) enviadas ao Laboratório Central do Hospital São Paulo (LCHSP) no período de março a dezembro de 2005 foram incluídas neste estudo. O número de amostras coletadas por paciente variou de acordo com a requisição médica.

4.1.2 - Critérios de Exclusão

Pacientes que não puderam ser avaliados para a definição do diagnóstico (pacientes transferidos para outras unidades de saúde, por exemplo) foram excluídos do estudo.

4.2 Parâmetros Clínicos e Epidemiológicos - Coleta de Dados

Os dados foram obtidos através da análise dos prontuários médicos dos pacientes solicitados ao Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do HSP. Foram obtidos dados de anamnese, exame físico, exames laboratoriais e radiológicos de cada prontuário de acordo com ficha clínica adaptada pelos pesquisadores da Rede de Estudos em Tuberculose do Brasil (REDE-TB) (Anexo 1). Após coleta dos dados dos prontuários, as fichas clínicas foram avaliadas por um infectologista.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo-Hospital São Paulo (Anexo 2).

4.3 - Coleta e Armazenamento do Material Biológico

Para execução deste trabalho foram utilizadas 210 amostras (escarro, aspirado traqueal, lavado brônquio-alveolar e líquido pleural), coletadas pelo serviço de enfermagem do Hospital São Paulo. As amostras foram enviadas ao Laboratório Central do Hospital São Paulo, Seção de Microbiologia, Setor de Micobactéria para pesquisa de BAAR e cultura.

As amostras recebidas pelo laboratório foram identificadas e processadas de acordo com o Protocolo Operacional de Procedimentos (POP) do laboratório (Anexo 3). Uma alíquota da amostra não processada (ANP) e uma alíquota do sedimento obtido após descontaminação e centrifugação (que denominamos sedimento) foram mantidas congeladas a -20°C até o momento de sua utilização.

4.4 - Baciloscopia e Cultura

Foram realizadas no Laboratório Central do Hospital São Paulo, Seção de Microbiologia, Setor de Micobactérias .

4.5 - Procedimentos Moleculares

Para realização do PCR colorimétrico em placa para detecção de *M. tuberculosis*, as amostras foram processadas e avaliadas sem o conhecimento dos resultados de baciloscopia e cultura, assim como da história clínica do paciente. Os protocolos de extração de DNA, reação de PCR e detecção por colorimetria em placa foram padronizados e cedidos com o kit fornecidos pela Dra. Maria Lucia Rossetti e colaboradores, do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Fundação de Pesquisa e Produção em Saúde (CDCT-

FEPPS) contendo todos os reagentes usados nos testes. Todas as etapas foram realizadas conforme o protocolo descrito em cada kit.

4.5.1 - Extração de DNA

Preparou-se o Controle Negativo de Extração (CNE), calculou-se o volume de Solução de Tampão (ST) e Solução hidroalcoólica a ser utilizado de acordo com o número de amostras. Uma alíquota de 500 μL de cada amostra clínica foi centrifugada por 10 min a 1290 g (12000 rpm), o sobrenadante desprezado e o sedimento foi lavado duas vezes com 200 μL de ST. Os tubos foram agitados em vórtex por 5 seg e centrifugados por 5 min a 1290 g (12000 rpm).

Os tubos foram colocados em termobloco a 100°C por 10 min incluindo o Controle Positivo de Extração (CPE) proporcionado no kit e depois foram centrifugados por 20 seg. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 5 μL de resina de sílica e agitado de forma manual e seqüencialmente durante 5 min. Depois da centrifugação por 1 min a 1290 g (12000 rpm) o sobrenadante foi descartado e 200 μL de solução hidroalcoólica foram adicionados ao sedimento que foi então agitado manualmente e centrifugado a 1290 g (12000 rpm) por 1 min. O sobrenadante foi retirado e descartado, os microtubos foram invertidos sobre papel absorvente até secar a resina.

Os sedimentos foram ressuspensos em 33 μL de ST, agitados manualmente e centrifugados a 1290 g (12000 rpm) por 1 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo previamente identificado, e armazenados a -20°C até o momento de processar a PC R.

4.5.2 - Amplificação por PCR da região IS6110 de *M. tuberculosis*

A reação de amplificação foi realizada utilizando os *primers* biotinizados INS-1CGTGAGGGCATCGAGGTGGC e INS-2 CGCTAGGCGTCGGTGACAAA derivados da seqüência de inserção IS6110 (Hermans *et al.*,1990). Na etapa de detecção colorimétrica foi utilizada uma sonda aminada complementar ao produto amplificado. Os *primers* e a sonda foram sintetizados pela empresa Invitrogen (Molecular Biology Incorporating Life Technologies™ and ResGen™ Brand).

Os tubos da reação foram preparados com 40 µL da MIX-PCR fornecido no Kit e 10 µL de DNA previamente extraído das amostras e dos controles de extração (CNE e CPE). Dois tubos adicionais foram preparados com 40 µL da MIX-PCR e 10 µL dos controles de reação (Controle Positivo de Reação - CPR e Controle Negativo de Reação - CNR).

Os tubos foram colocados no termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) programado com as condições de amplificação descritas no protocolo que acompanha o kit: desnaturação a 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 2 min, 68°C por 2 min, 72°C por 2 min, e uma extensão final a 72°C por 5 min, estabilização e parada de reação a 4°C.

Após o término da PCR os microtubos foram guardados a -20°C até o momento da detecção por gel e placa.

4.5.2.1 - Detecção dos Produtos Amplificados em Gel de Agarose

O gel pronto foi proporcionado com o kit. Utilizou-se tampão TBE 1X (não incluído no kit) para a eletroforese programando a fonte para 5 volts/cm de gel por um período de aproximadamente 30 min. As amostras foram preparadas adicionando-se tampão de amostra na proporção de 1:5 do volume total. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador UV. Para a confirmação do tamanho de fragmentos de DNA utilizou-se padrão de peso molecular de 100 pb ou de um kb.

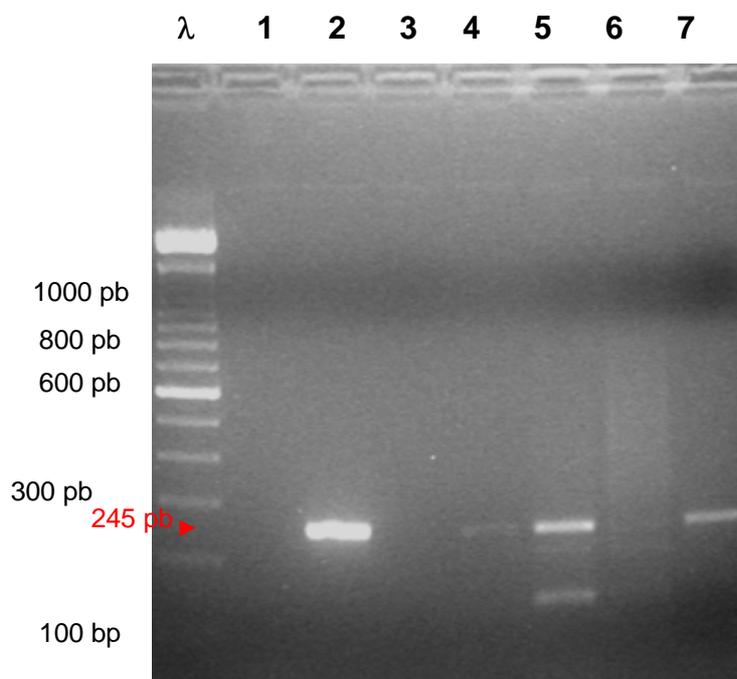


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose (1,5%). Análise dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA de *M. tuberculosis* extraído de amostras clínicas. Padrão de peso molecular de 100 pb; 1 - controle negativo de extração; 2 - controle positivo de extração; 3 - controle negativo de reação; 4 - controle positivo de reação; 5 - amostra positiva; 6 - amostra negativa e 7 - controle positivo de reação.

4.5.2.2 - Detecção dos Produtos Amplificados por Colorimetria em Placa Amino Link

A etapa de detecção colorimétrica dos produtos amplificados por PCR foi realizada no CDCT-FEPPS. Segue um resumo da metodologia utilizada.

A detecção dos produtos amplificados biotinilados foi realizada por hibridização utilizando placa de ELISA. Uma sonda aminada foi previamente fixada aos micropoços. Etapas de lavagem posteriores a hibridização foram utilizadas. Posteriormente, o conjugado enzimático estreptavidina peroxidase foi adicionado. Como revelador da reação foi utilizado TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico. Os resultados foram observados através de leitura em equipamento Leitor de ELISA em comprimentos de onda de 450nm e re-filtro de 620nm.

O valor do controle negativo foi subtraído de cada valor da leitura, considerando-se resultado positivo a partir de 0,275.

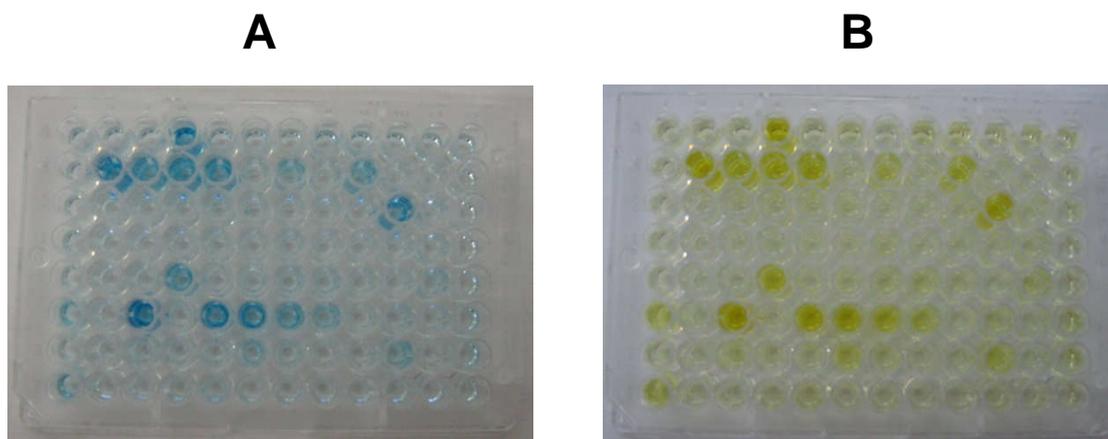


Figura 6. Resultados da detecção colorimétrica em placas de ELISA. A) Visualização dos resultados após a adição do substrato TMB; B) Visualização dos resultados após a adição da solução de parada. Nesta etapa foi realizada a leitura dos resultados em equipamento leitor de placas de ELISA.

4.6 - Análise Estatística dos Dados

O passo inicial da análise dos dados consistiu na descrição geral dos mesmos, a partir de tabela de dados utilizando o programa de planilha *Microsoft Excel* e *SSPS 13.0 for Windows*. Foram construídas tabelas de contingência com os dados de interesse na pesquisa (Agrestil, 2000). Em seguida, para avaliar as concordâncias do ponto de vista estatístico, empregou-se a estatística kappa. Foram calculadas a sensibilidade e a especificidade como medidas de eficácia diagnóstica do PCR colorimétrico com respeito à cultura. Para estimar a validade do teste com respeito ao diagnóstico clínico calculamos os valores preditivo positivo e negativo.

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico DAG_Stat (Kraemer 1992) e o programa estatístico *Probabilitas* contido na página web <http://www.vademecum.com.br/iatros/index.htm>. Utilizamos o nomograma de Fagan para os cálculos de probabilidade pós-teste (Greenhalg, 1997).

5. RESULTADOS

5.1 - Análise Descritiva

Neste estudo foram incluídas amostras clínicas de 150 pacientes internados no Hospital São Paulo, com suspeita clínica de tuberculose, no período de Março a Dezembro de 2005. Foram coletadas amostras clínicas de todos os pacientes, sendo que para cada caso foi coletada a amostra mais indicada pelo médico, a saber: escarro, lavado bronco-alveolar (LBA), aspirado traqueal, ou líquido pleural. Todos os pacientes realizaram pelo menos uma vez a coleta de amostra, sendo que 42 pacientes realizaram duas, 17 realizaram três e apenas um único paciente realizou quatro coletas. Devido ao diferente número de coletas realizadas pelos pacientes, foram avaliadas no presente estudo 210 amostras clínicas.

Dentre as 210 amostras coletadas a distribuição foi de 148 escarros (70,5%), 47 LBA (22,4%), 14 aspirados traqueais (6,7%) e uma única amostra de líquido pleural (0,5%).

A baciloscopia direta foi realizada em 197 amostras clínicas das 210 incluídas no estudo (93,8%). Os resultados são mostrados na Tabela I. Treze amostras (6,2%) não foram processadas, uma vez que foi solicitada apenas cultura.

Tabela I. Resultado da baciloscopia direta de acordo com o tipo de amostra

Amostra clínica	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Escarro	15 (7,6)	129 (65,5)	144 (73,1)
LBA	2 (1,0)	40 (20,3)	42 (21,4)
Aspirado traqueal	1 (0,5)	9 (4,6)	10 (5,1)
Líquido pleural	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,5)
Total	18 (9,1)	179 (90,9)	197 (100,0)

A PCR colorimétrica da ANP foi realizada com 206 amostras e 4 (1,9%) não foram avaliadas por esse método por insuficiência de material. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela II.

Tabela II. Resultado da PCR colorimétrica da ANP de acordo com o tipo amostra

Amostra clínica	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Líquido pleural	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,5)
Aspirado traqueal	1 (0,5)	12 (5,8)	13 (6,3)
Escarro	12 (5,8)	134 (65,0)	146 (70,8)
LBA	3 (1,5)	43 (20,9)	46 (23,4)
Total	16 (7,8)	190 (92,2)	206 (100,0)

A baciloscopia e a PCR colorimétrica também foram realizadas utilizando-se o sedimento. De todas as 210 amostras, a partir de uma alíquota do produto descontaminado e concentrado, procedimento este que antecedeu à cultura. Vinte e quatro (11,4%) amostras apresentaram resultado positivo na baciloscopia do sedimento, como pode ser visto na Tabela III.

Tabela III. Resultado do método baciloscopia do sedimento de acordo com o tipo de amostra

Amostra clínica	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total n (%)
Líquido pleural	0 (0,0)	1(0,5)	1 (0,5)
Aspirado traqueal	1 (0,5)	13 (6,2)	14 (6,7)
Escarro	21 (10,0)	127 (60,5)	148 (70,5)
LBA	2 (1,0)	45 (21,4)	47 (22,4)
Total	24 (11,4)	186 (88,6)	210 (100,0)

Com a PCR colorimétrica realizada a partir do sedimento foram obtidos 19 (9,0%) resultados positivos (Tabela IV).

Tabela IV. Resultado da PCR colorimétrica do sedimento de acordo com o tipo de amostra

Amostra clínica	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Líquido pleural	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,5)
Aspirado traqueal	3 (1,4)	11 (5,2)	14 (6,7)
Escarro	15 (7,1)	133 (63,3)	148 (70,5)
LBA	1 (0,5)	46 (21,9)	47 (22,4)
Total	19 (9,0)	191 (90,1)	210 (100,0)

Das 210 culturas realizadas, 7 (3,3%) não puderam ser analisadas por estarem contaminadas e foram descartadas das análise. A tabela V mostra que 31 (15,3%) culturas foram positivas. Em 29 das culturas foi identificada *M. tuberculosis* e em 2 (1,0%) culturas houve crescimento de *M. fortuitum* e *M. avium* respectivamente (Tabela V).

Tabela V. Resultado da cultura de acordo com o tipo de amostra

Amostra clínica	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Líquido pleural	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,5)
Aspirado traqueal	1 (0,5)	12 (5,9)	13 (6,7)
Escarro	*25 (12,3)	117 (57,6)	142 (70,5)
LBA	5 (2,5)	42 (20,7)	47 (22,4)
Total	31 (15,3)	172 (84,3)	203 (100,0)

* *M. fortuitum* e *M. avium*

O diagnóstico clínico definitivo de 146 (97,3%) pacientes foi obtido pela análise dos prontuários e quatro (2,7%) não foram localizados. O diagnóstico de 35 (24%) pacientes foi definido como (TBP), dentre os quais 12 (34,3%) não apresentaram associação a outra doença de base, 6 (17,1%) pacientes apresentaram TBP associado a outra doença de base (não portadores do HIV, porém com câncer, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, DPOC, e Pneumonia, entre outras) e 17 (48,6%) tiveram diagnóstico de TBP associado ao HIV (Tabela VI).

Tabela VI. Distribuição do número de pacientes de acordo com o diagnóstico clínico

Diagnóstico	Pacientes
TBP	12
TBP+ doença base	6
TBP + HIV	17
Outro diagnóstico	111
Total	146

Para construção das tabelas a seguir, nos casos em que os pacientes tiveram coleta de mais de uma amostra, considerou-se só um resultado final, prevalecendo o resultado positivo.

Como poderser visualizado em destaque na Tabela VII, 24(17,5%) pacientes com diagnóstico clínico de TBP associado ou não a outras doenças apresentaram baciloscopia direta negativa. Amostras de 9 pacientes não tiveram resultado por ter sido solicitada só cultura.

Tabela VII. Resultados de baciloscopia direta de acordo com o diagnóstico clínico

Diagnóstico	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
TBP	5 (3,6)	7 (5,1)	12 (8,8)
TBP+ doença base	3 (2,2)	3 (2,2)	6 (4,4)
TBP+HIV	3 (2,2)	14 (10,2)	17 (12,4)
Outro diagnóstico	0 (0,0)	102 (74,5)	102 (74,5)
Total	11 (8,0)	126 (92,0)	137 (100,0)

A PCR colorimétrica da ANP foi realizada nas amostras de 144 pacientes, pois em 2 casos não houve material suficiente para a extração do DNA. Em destaque, 25 (17,36%) amostras correspondentes ao grupo com diagnóstico de TBP apresentaram resultado negativo. Em duas (1,3%) amostras correspondentes a pacientes com outros diagnósticos, o resultado foi positivo (Tabela VIII).

Tabela VIII. Resultado da PCR colorimétrica da ANP de acordo com o diagnóstico clínico

Diagnóstico	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
TBP	6 (4,2)	6 (4,2)	12 (8,3)
TBP+ doença base	2 (1,4)	4 (2,8)	6 (4,2)
TBP+HIV	2 (1,4)	15 (10,4)	17 (11,8)
Outro diagnóstico	2 (1,4)	107 (74,3)	109 (75,7)
Total	12 (8,3)	132 (91,7)	144 (100,0)

Em relação à baciloscopia do sedimento, obteve-se resultado negativo em 20 (13,6%) amostras de pacientes diagnosticados clinicamente como portadores de TBP (Tabela IX).

Tabela IX. Resultado da baciloscopia do sedimento de acordo com o diagnóstico clínico

Diagnóstico	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
TBP	8 (5,5)	4 (2,7)	12 (8,2)
TBP+ doença base	3 (2,1)	3 (2,1)	6 (4,1)
TBP+HIV	4 (2,7)	13 (8,9)	17 (11,6)
Outro diagnóstico	0 (0,0)	111 (76,0)	111 (76,0)
Total	15 (10,3)	131 (89,7)	146 (100,0)

Vinte e cinco (17,1%) amostras, referentes ao grupo de pacientes com diagnóstico clínico de TBP, apresentaram resultado negativo ao PCR

colorimétrico do sedimento. No grupo de pacientes com outros diagnósticos clínicos, 3 (2,1%) apresentaram resultado positivo (Tabela X).

Tabela X. Resultado da PCR colorimétrica do sedimento de acordo com o diagnóstico clínico

Diagnóstico	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
TBP	5 (3,4)	7 (4,8)	12 (8,2)
TBP+ doença base	3 (2,1)	3 (2,1)	6 (4,2)
TBP+HIV	2 (1,3)	15 (10,2)	17 (11,5)
Outro diagnóstico	3 (2,1)	108 (74,0)	111 (76,1)
Total	13 (8,9)	133 (91,1)	146 (100,0)

No total foram analisadas 146 culturas, das quais duas culturas estavam contaminadas, restando as 144 apresentadas na Tabela XI. Embora correspondam ao grupo de pacientes com diagnóstico clínico de TBP, 16 (11,1%) culturas apresentaram resultado negativo, como pode ser visto na Tabela XI. Por outro lado, duas (1,3%) amostras de pacientes com outro diagnóstico, apresentaram cultura positiva.

Tabela XI. Resultado da cultura para *M. tuberculosis* de acordo com o diagnóstico clínico

Diagnóstico	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
TBP	9 (6,3)	3 (2,1)	12 (8,3)
TBP+ doença base	3 (2,1) ^a	3 (2,1)	6 (4,2)
TBP+HIV	7 (4,9)	10 (6,9)	17 (11,8)
Outro diagnóstico	2 (1,4) ^b	107 (74,3)	109 (75,7)
Total	21 (14,7)	123 (85,4)	144 (100,0)

Cultura identificada como ^a*M. fortuitum* e ^b*M. avium*

Uma informação clínica considerada importante foi a ocorrência de tratamento prévio ou não à internação. A Tabela XII mostra que dos 35 pacientes diagnosticados como TBP isolada ou associada a outra doença, 12 (34,3%) foram tratados previamente para TBP.

Tabela XII. Distribuição dos pacientes de acordo com o diagnóstico clínico, considerando a ocorrência de tratamento prévio ou não

Tratamento	TBP	TBP+ doença base	TBP+HIV	Outro diagnóstico	Total
Prévio					
Sim	4 (2,7)	1 (0,7)	7 (4,8)	0 (0,0)	12 (8,2)
Não	8 (5,5)	5 (3,4)	10 (6,8)	111 (76,0)	134 (91,8)
Total	12 (8,2)	6 (4,1)	17 (11,6)	111 (76,0)	146 (100,0)

Como pode ser visto na Tabela XIII, 5 pacientes com diagnóstico de TBP, 2 com TBP + doença de base e 7 com TBP + HIV não receberam tratamento prévio e apresentaram resultado negativo na baciloscopia direta. Dois pacientes com diagnóstico de TBP que receberam tratamento prévio apresentaram resultado positivo na baciloscopia.

Tabela XIII. Resultado da baciloscopia direta de acordo com o diagnóstico clínico, considerando tratamento prévio e sem tratamento

Diagnóstico	Tratamento prévio	Positivo	Negativo	Total
TBP	sim	2	2	4
	não	3	5	8
	Total	5	7	12
TBP+ doença base	sim	0	1	1
	não	3	2	5
	Total	3	3	6
TBP+HIV	sim	0	7	7
	não	3	7	10
	Total	3	14	17
Outro diagnóstico	sim	0	0	0
	não	0	102	102
	Total	0	102	102

Considerando a realização de tratamento prévio, em relação ao resultado da PCR colorimétrica da ANP, pode-se observar que entre os pacientes com diagnóstico de TBP 3 pacientes sem tratamento apresentaram

resultado negativo, o mesmo resultado foi encontrado em 3 pacientes com TBP + outras doenças de base e em 8 com TBP + HIV (Tabela XIV).

Tabela XIV. Resultado da PCR colorimétrica da ANP de acordo com o diagnóstico clínico, considerando tratamento prévio e sem tratamento

Diagnóstico	Tratamento prévio	Positivo	Negativo	Total
TBP	sim	1	3	4
	não	5	3	8
	Total	6	6	12
TBP+ doença base	sim	0	1	1
	não	2	3	5
	Total	2	4	6
TBP+HIV	sim	0	7	7
	não	2	8	10
	Total	2	15	17
Outro diagnóstico	sim	0	0	0
	não	2	107	109
	Total	2	107	109

Na Tabela XV observamos que 2 pacientes diagnosticados como portadores de TBP e com TBP + outras doenças de base e 6 pacientes com TBP + HIV sem tratamento apresentaram resultado negativo para baciloscopia do sedimento. Já entre os pacientes que haviam recebido tratamento prévio, apenas 2 com TBP apresentaram baciloscopia positiva.

Tabela XV. Resultado da baciloscopia do sedimento de acordo com o diagnóstico clínico, considerando ocorrência de tratamento prévio ou não

Diagnóstico	Tratamento prévio	Positivo	Negativo	Total
TBP	sim	2	2	4
	não	6	2	8
	Total	8	4	12
TBP+ doença base	sim	0	1	1
	não	3	2	5
	Total	3	3	6
TBP+HIV	sim	0	7	7
	não	4	6	10
	Total	4	13	17
Outro diagnóstico	sim	0	0	0
	não	0	111	111
	Total	0	111	111

Entre os resultados negativos encontrados na PCR colorimétrica do sedimento, verificou-se que, entre os pacientes sem tratamento prévio, 4 tinham TBP, 2 apresentavam TBP + doença de base e 8 foram diagnosticados como TBP + HIV. Resultado positivo foi observado em apenas 1 paciente que apresentava TBP e havia realizado tratamento prévio (Tabela XVI).

Tabela XVI. Resultado da PCR colorimétrica do sedimento de acordo com o diagnóstico clínico, considerando tratamento prévio e sem tratamento

Diagnóstico	Tratamento prévio	Positivo	Negativo	Total
TBP	sim	1	3	4
	não	4	4	8
	Total	5	7	12
TBP+ doença base	sim	0	1	1
	não	3	2	5
	Total	3	3	6
TBP+HIV	sim	0	7	7
	não	2	8	10
	Total	2	15	17
Outro diagnóstico	sim	0	0	0
	não	3	108	111
	Total	3	108	111

Quanto aos resultados da cultura, houve ausência de crescimento de micobactérias no material de 1 paciente com TBP, 2 com TBP + doença de base e 5 com TBP + HIV os quais não haviam recebido tratamento prévio. Por outro lado a cultura apresentou-se positiva para amostras de 2 pacientes com TBP e 2 com TBP + HIV que haviam recebido tratamento prévio e no material de 2 pacientes com outro diagnóstico e sem tratamento para TBP (Tabela XVII).

Tabela XVII. Resultado da cultura de acordo com o diagnóstico clínico, considerando tratamento prévio e sem tratamento

Diagnóstico	Tratamento prévio	Positivo	Negativo	Total
TBP	sim	2	2	4
	não	7	1	8
	Total	9	3	12
TBP+ doença base	sim	0	1	1
	não	3	2	5
	Total	3	3	6
TBP+HIV	sim	2	5	7
	não	5	5	10
	Total	7	10	17
Outro diagnóstico	sim	0	0	0
	não	2	107	109
	Total	2	107	109

Tabela XVIII. Resumo dos resultados das análises descritas

Método de Análise	Resultado	Amostras TBP			Amostras TBP			Pacientes com			Pacientes sem			Total de	
		positivas			negativas			TBP			TBP			amostras	
		nº	%	(%T)	nº	%	(%T)	nº	%	(%T)	nº	%	(%T)	nº	%
Baciloscopia direta	Positivo	18,0	33,3	(09,1)	0,0	0,0	(0,0)	11	31,4	(5,6)	0,0	0,0	(0,0)	18,0	9,1
	Negativo	36,0	66,7	(18,3)	140	100,0	(71,1)	24	68,6	(12,2)	102	91,9	(51,8)	179	90,9
	Total	54,0	100,0	(27,4)	140	100,0	(71,1)	35	100,0	(17,8)	111*	100,0	(56,3)	197	100,0
PCR colorimétrica do ANP	Positivo	14,0	25,5	(06,8)	02	01,3	(1,0)	10	28,6	(4,8)	02	01,8	(01,0)	16,0	7,8
	Negativo	41,0	74,5	(19,9)	145	96,0	(70,4)	25	71,4	(12,1)	107	96,4	(51,9)	190	92,2
	Total	55,0	100,0	(26,7)	151*	100,0	(73,3)	35	100,0	(16,9)	111*	100,0	(53,9)	206	100,0
Baciloscopia do sedimento	Positivo	24,0	43,6	(11,4)	0,0	0,0	(0,0)	15	42,9	(7,1)	0,0	0,0	(0,0)	24,0	11,4
	Negativo	31,0	56,4	(14,8)	151	100,0	(71,9)	20	57,1	(9,5)	111	100,0	(52,9)	186	88,6
	Total	55,0	100,0	(26,2)	155*	100,0	(71,9)	35	100,0	(16,6)	111	100,0	(52,9)	210	100,0
PCR colorimétrica do sedimento	Positivo	16,0	29,0	(07,6)	03	1,9	(1,4)	10	28,6	(4,7)	03	02,7	(01,4)	19,0	9,0
	Negativo	39,0	71,0	(18,6)	148	95,48	(70,5)	25	71,4	(11,9)	108	97,3	(51,4)	191	91,0
	Total	55,0	100,0	(26,2)	155*	100,0	(73,8)	35	100,0	(16,6)	111	100,0	(52,9)	210	100,0
Cultura	Positivo	29,0	52,7	(14,3)	02	1,3	(01,0)	19	54,3	(9,3)	02	01,8	(01,0)	31,0	15,3
	Negativo	24,0	43,6	(11,8)	144	97,3	(70,9)	16	45,7	(7,8)	107	96,4	(52,7)	172	84,3
	Total	55,0	100,0	(27,1)	148*	100,0	(72,9)	35	100,0	(17,2)	111*	100,0	(54,7)	203	100,0

*A soma não corresponde ao total uma vez que nesses casos algumas amostras não foram processadas, por falta de material.

Os resultados negativos da baciloscopia direta e baciloscopia do sedimento correspondem a 86,3% (126/146) e 89,7% (131/146) dos pacientes, respectivamente. Além disso, 85,4% (123/144) dos pacientes também apresentaram culturas negativas. Com base nos dados clínicos conclui-se que apenas 23,9% (35/146) dos 150 pacientes incluídos no nosso estudo, apresentaram alguma forma de TBP (Tabela XII).

Quando os resultados dos testes microbiológicos foram analisados em relação aos pacientes com diagnóstico clínico de TBP (35/146), 68,6% (24/35) dos resultados de baciloscopia direta, 57,1% (20/35) da baciloscopia do sedimento e 45,7% (16/35) da cultura foram negativos.

Os resultados das 210 amostras analisadas foram negativos em 90,1% (179/197), 88,6% (186/210) e 84,3% (172/203) em relação à baciloscopia direta, do sedimento e cultura, respectivamente.

A análise de 206 ANP e 210 sedimentos por PCR colorimétrica apresentou resultados negativos em 92,2% (190/206) e 91,0% (191/210), respectivamente. Em relação ao número de pacientes (n=146), foram obtidos 88,6% e 84,3% resultados negativos para a PCR colorimétrica da ANP e do sedimento, respectivamente. Se considerarmos ainda apenas os 35 pacientes com diagnóstico clínico de TBP, os resultados negativos foram de 71,4% (25/35) para ambos os experimentos (Tabela XVIII).

5.2 - Análise Correlacional

Comparando a baciloscopia direta com a PCR colorimétrica, podemos observar que houve uma pequena discrepância entre os resultados. Como podemos observar em destaque na Tabela XIX a baciloscopia apresentou 7

resultados positivos, não detectados pela PCR colorimétrica e a PCR colorimétrica apresentou 5 resultados positivos não detectados na baciloscopia direta.

Tabela XIX. Distribuição das amostras com relação às avaliações pelos métodos de PCR colorimétrica e baciloscopia direta

Baciloscopia direta \ PCR colorimétrica	Positivo	Negativo	Sem resultado	Total
	Positivo	11	5	0
Negativo	7	170	13	190
Sem resultado	0	4	0	4
Total	18	179	13	210

A Tabela XX também demonstra uma pequena diferença entre os resultados da baciloscopia do sedimento *versus* PCR colorimétrica. Essa diferença é observada para os resultados negativos.

Tabela XX. Distribuição das amostras com relação às avaliações pela PCR colorimétrica e baciloscopia do sedimento

Baciloscopia do sedimento \ PCR Colorimétrica	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	15	4
Negativo	9	182	191
Total	24	186	210

A comparação entre a PCR colorimétrica da ANP *versus* cultura e PCR colorimétrica do sedimento *versus* cultura podem ser observados na Tabelas XXI e XXII, respectivamente.

Tabela XXI. Distribuição das amostras com relação às avaliações pelos métodos de PCR colorimétrica da ANP e da cultura

Cultura \ PCRc. ANP	Cultura			Total
	Positivo	Negativo	Contaminada	
Positivo	13	3	0	16
Negativo	18	165	7	190
Sem resultado	0	4	0	4
Total	31	172	7	210

Tabela XXII. Distribuição das amostras com relação às avaliações pelos métodos de PCR colorimétrica do sedimento e da cultura

Cultura \ PCRc sedimento	Cultura			Total
	Positivo	Negativo	Contaminada	
Positivo	15	4	0	19
Negativo	16	168	7	191
Total	31	172	7	210

5.3 - Análise Inferencial

Considerando as 210 amostras, de acordo com o critério da estatística Kappa, podemos afirmar que a PCR colorimétrica, tanto da ANP como do sedimento, apresenta uma boa concordância com respeito à cultura (Tabelas XXIII e XXIV).

Tabela XXIII. Resultados do estudo de concordância entre a PCR colorimétrica da ANP e os outros testes

	Kappa	Intervalo de confiança	
B. direta	0,6131	0,4130	0,8132
Cultura	0,5	0,3247	0,6829

Tabela XXIV. Resultados do estudo de concordância entre a PCR colorimétrica do sedimento e os outros testes

	Kappa	Intervalo de confiança	
B.sedimento	0,6637	0,4940	0,8334
cultura	0,5481	0,3191	0,6977

A especificidade da PCR colorimétrica (ANP e sedimento) em relação à cultura foi de 98%. Essa estimativa pode ser visualizada nas Tabelas XXV e XXVI, respectivamente. Outro resultado relevante que ainda podemos verificar

nestas tabelas é que a sensibilidade para a PCR colorimétrica da ANP e sedimento em relação à cultura foi de 41% e 48%, respectivamente.

Tabela XXV. Medidas de eficácia diagnóstica da PCR colorimétrica da ANP em relação à Cultura

	Estimativa	Intervalo de confiança	
Especificidade	0,9821	0,9487	0,9963
Sensibilidade	0,4193	0,2485	0,6092

Tabela XXVI. Medidas de eficácia diagnóstica da PCR colorimétrica do sedimento em relação à Cultura

	Estimativa	Intervalo de confiança	
Especificidade	0,9767	0,9415	0,9931
Sensibilidade	0,4838	0,3015	0,6694

A concordância do teste PCR colorimétrico com respeito ao diagnóstico clínico de TBP é fraca ($\kappa=0,34$ e $0,33$ com $IC=[0,1677-0,5205$ e $0,1522-0,5070]$, respectivamente) tanto para a PCR colorimétrica da ANP quanto para a PCR colorimétrica do sedimento (Tabela XXVII).

Tabela XXVII. Resultado do estudo de concordância entre os testes utilizados e o Diagnóstico Clínico de TBP

	Kappa	Intervalo de confiança	
B. direta	0,406	0,2320	0,5793
PCR colorimétrica da ANP	0,344	0,1677	0,5205
B. sedimento	0,533	0,3646	0,7010
PCR colorimétrica do sedimento	0,330	0,1522	0,5070
Cultura	0,607	0,4475	0,7664

Em relação ao diagnóstico clínico de TBP observamos que os resultados de sensibilidade (28,6%), especificidade (98,2%) tanto para a PCR colorimétrica da ANP como para o sedimento. Os valores preditivo positivo foram de 83,3% e 76,9% para a PCR colorimétrica da ANP e sedimento e os valores preditivo negativo foram de 81,1% e 87,0%, respectivamente para ambos os testes (Tabela XXVIII).

Tabela XXVIII. Medidas de eficácia diagnóstica dos métodos utilizados no estudo em que a Prevalência TBP foi de 23,9% (35/146)*.

Métodos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor Preditivo Positivo (%)	Valor Preditivo Negativo (%)	Probabilidade Pré-teste (%)	Probabilidade Pós-teste (%)		Acurácia %	Verossimilhança		Kappa
Conceito da análise estatística	Proporção de indivíduos doentes com teste positivo	Proporção de indivíduos sadios com teste negativo	Se resultado positivo, qual probabilidade do paciente ter realmente a doença	Se resultado negativo, qual probabilidade do paciente não ter a doença	(Prevalência) proporção de pessoas com a doença em estudo, em uma população de risco	chance do teste estar correto		Proporção de testes verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos, em relação o total de resultados	Quantas vezes é provável encontrar resultado + em pessoas doentes comparado com não doentes ou – em não doentes comparados com doentes		Grau de concordância (0,2=pobre 0,21-0,4= fraca; 0,41-0,6= moderada; 0,61-0,8= boa; >0,8=muito boa)
fórmulas	$a/a+c$	$d/b+d$	$a/a+b \times 100$	$d/d+c \times 100$	$a+c/a+b+c+d$	Positivo Negativo		$a+d/a+b+c+d$	Vr(+) = $S/1-E$ Vr(-) = $1-S/E$ Positivo Negativo		$P_O - P_E / 1 - P_E$
Baciloscopia direta	31,4	100,0	100,0	81,0	25,5	-	-	82,5	-	0,70	0,41
PCRc da ANP	28,6	98,2	83,3	81,1	24,3	83,3	18,9	81,3	15,6	0,70	0,34
Baciloscopia sedimento	42,9	100,0	100,0	84,7	24,0	-	-	86,3	-	0,60	0,53
PCR c do sedimento	28,6	97,3	76,9	81,2	24,0	76,9	18,8	80,8	10,6	0,70	0,33
Cultura	54,3	98,2	90,5	87,0	24,3	90,5	13,0	87,5	29,6	0,47	0,61

* resultado válido para o grupo de pacientes incluídos neste trabalho. Cálculos baseados em: <http://www.vademecum.com.br/iatros/index.htm>

A prevalência de TBP, para o nosso grupo de pacientes, foi de 23,9% este é um índice importante porque nos ajuda a compreender melhor o desempenho do teste sob o prisma da clínica uma vez que a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN podem variar de acordo com a prevalência do local.

A razão de verossimilhança ou Likelihood Ratio (Vr ou LR) é uma ferramenta importante para a prática clínica e laboratorial na análise de um teste diagnóstico, definida como a possibilidade do resultado de um teste em particular para uma pessoa com a doença de interesse, dividido pela probabilidade daquele resultado de teste para uma pessoa sem a doença de interesse. A aplicação na clínica fica facilitada quando se usa o nomograma de Fagan (Figura 7) que permite estimar a probabilidade pós-teste (83,3% e 76,9%) quando determinada a probabilidade pré-teste (24,3% e 24,0%) e Vr (15,9 e 10,6). Ajuda a definir quantas vezes aumentou ou diminuiu a chance do paciente que tem um teste positivo ou negativo realmente ser portador da doença em questão.

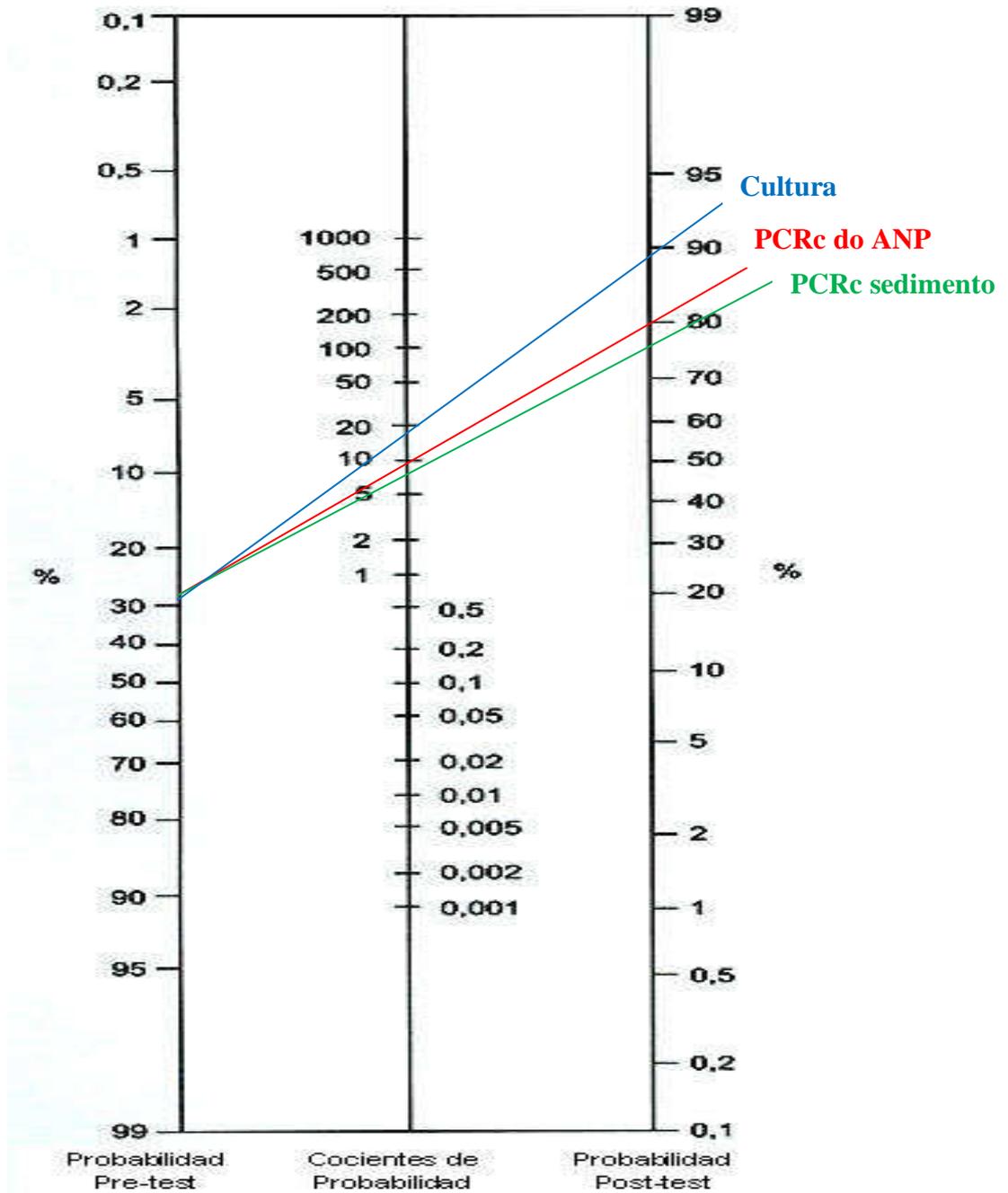


Figura 7. Nomograma de Fagan

6. DISCUSSÃO

A detecção rápida e precisa de *M. tuberculosis* tem um forte impacto no cuidado e tratamento de pessoas infectadas e no controle da tuberculose na população. Ante o crescente número de casos de tuberculose multiresistente à drogas, o CDC (1992) definiu, no início da década de 90, alguns objetivos para o diagnóstico microbiológico da TBP, que incluem: a comunicação do resultado da baciloscopia ao clínico em 24 horas; detecção do BAAR em 14 dias por cultura ; identificação da espécie em 17 a 21 dias e disponibilidade do resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos em 28 dias.

Também o isolamento dos pacientes internados com TBP ativa é importante para evitar a transmissão da tuberculose hospitalar. Recomenda-se dentro da instituição o isolamento de todos os pacientes potencialmente contagiosos em quarto-leito individual o com pressão negativa. Os doentes devem permanecer em isolamento até que sejam obtidos 3 resultados negativos da baciloscopia ou até que apresentem boa resposta clínica ao tratamento além de 3 baciloscopias negativas (Wisnivesky *et al.*, 2005).

A aplicação destas orientações tem-se traduzido em diminuição da transmissão de tuberculose em algumas instituições. A diminuição das taxas de TBP nos EUA e menores taxas de hospitalização de pessoas com tuberculose conduziram a baixa prevalência de TBP entre doentes isolados por causa da suspeita da doença. Embora seja elevado o número de isolamentos de doentes com baixo risco de TBP, a identificação demorada dos pacientes com TBP é um grande problema.

É comum a identificação de pacientes com TBP pelos resultados da baciloscopia, porém a sensibilidade deste teste não é alta (50-60%) (Chan *et*

al., 2000) e já foi reportada a transmissão de TBP por pacientes com baciloscopia negativa (Anderson *et al.*, 1995; Behr *et al.*, 1999).

A utilização de recursos rápidos e eficientes na identificação dos doentes com baixo risco de TBP poderia ajudar a reduzir os custos hospitalares. Esses critérios devem basear-se na presença de fatores de risco, achados físicos e radiografia torácica, embora se deve considerar que a associação de TBP com SIDA trouxe profundas modificações nas características de apresentação da doença. O diagnóstico da tuberculose em pacientes com SIDA é geralmente mais difícil do que no paciente imunocompetente, pela rápida evolução e apresentação menos característica. Por isso, vários casos são diagnosticados tardiamente, e muitas vezes não se confirma o diagnóstico (Kramer *et al.*, 1990); além do mais a infecção pelo HIV esteve presente em mais de 80% de 6 surtos de tuberculose multiresistente a drogas ocorridos em 1990 a 1992, nos EUA (Ellner *et al.*, 1993).

Nos casos de suspeita de tuberculose extrapulmonar, além desses testes, são utilizados também métodos anátomo-patológicos, citológicos, sorológicos, bioquímicos e de biologia molecular, conforme a disponibilidade nos serviços de saúde e laboratórios de referência (Ministério da Saúde, 1994; Ministério da Saúde, 1997).

A baciloscopia é o exame mais empregado na rotina diagnóstica da tuberculose em função da sua simplicidade, rapidez e baixo custo (Ministério da Saúde, 1997). A baciloscopia tem algumas limitações, dentre as quais podemos citar o grande número de bacilos necessário para a positividade do teste. O exame só é positivo em amostras com pelo menos 10.000 bacilos/mL, o que limita a sensibilidade do teste. Conseqüentemente se deduz que apenas

lesões razoavelmente extensas, com grande população bacilar, podem apresentar baciloscopia positiva. Outro inconveniente é o fato de o resultado apenas identificar o microrganismo como BAAR, portanto, a interpretação dependerá da prevalência da tuberculose e de outras micobacterioses no local onde o teste é empregado, visto ser ele incapaz de diferenciar espécies de micobactérias, o que pode influenciar negativamente na sua especificidade (Ministério da Saúde, 1994).

A sensibilidade e especificidade da baciloscopia têm sido avaliadas periodicamente em várias revisões e, embora seus valores variem consideravelmente nos diferentes estudos, é claro que a baciloscopia continua sendo um passo imprescindível na avaliação diagnóstica da tuberculose (Chakravorry *et al.*, 2005). Levy e colaboradores (1989) num estudo de 2560 escarros provenientes de 727 pacientes do Hospital Hilbrow reportaram sensibilidade de 53,1% e especificidade de 99,8%, com valor preditivo positivo de 98,5%. Gordin & Slutkin (1990) revisando os resultados de baciloscopia no Hospital Geral de São Francisco encontraram sensibilidade variando entre 45,75 e 55,3% num período de 8 anos. A especificidade sempre foi de 99%, e o valor preditivo positivo ficou entre 91,5% a 98% no período estudado.

Kim e colaboradores (1984) demonstraram sensibilidade de até 74,4%, uma vez que 727 de 977 pacientes com tuberculose pulmonar tiveram baciloscopia positiva antes de iniciar o tratamento.

A sedimentação combinada com a citocentrifugação aumenta a sensibilidade na detecção dos bacilos ácido-álcool resistentes nos esfregaços de escarro. Fodor (1995) estudou a eficácia da sedimentação combinada com a citocentrifugação do escarro na preparação de esfregaço para a detecção de

micobactérias. Obteve 32 esfregaços positivos para BAAR, sendo que em 26 casos os resultados foram melhores que com a baciloscopia direta. Encontrou-se mais bacilos em 20 casos, e em 6 casos o resultado foi positivo só com o método de citocentrifugação. A diferença no número de bacilos foi de 100 a 200 vezes em 5 amostras e de 10 vezes em 12 amostras comparadas com a baciloscopia direta concluindo que a técnica aplicada é adequada para o cultivo e para a baciloscopia a partir do mesmo sedimento.

Em nosso estudo na rotina laboratorial de um Hospital Geral Universitário sem seleção prévia dos pacientes por critério clínico, no total de 210 amostras obtivemos positividade em 33,3% na baciloscopia direta e 31,4% quando consideramos as amostras dos pacientes com diagnóstico clínico de TBP. Por outro lado, a positividade na baciloscopia do sedimento foi de 43,6%, e 42,9%, respectivamente. Nossos resultados da baciloscopia do sedimento confirmam os achados da literatura em que a detecção de BAAR é mais eficiente que a observada com a baciloscopia direta.

De acordo com a literatura, variações observadas nos resultados da baciloscopia podem ser explicadas pela apresentação da doença (cavitária ou miliar), espécie de micobactéria e sua prevalência, eficácia da descontaminação e concentração, espessura e extensão do esfregaço, tipo de coloração, descoloração, o treino e a experiência de quem vai avaliar a lâmina (Pfaller, 1994). Wobeser e colaboradores (1996) em estudo de 1480 espécimes no Canadá, evidenciaram crescimento de micobactérias em 218, o que representa 14,7%. Deste total, 170 (78%) foram isolados de escarro ou lavado broncoalveolar e, destes espécimes, 63 (37%) foram positivos na baciloscopia. Das 63 amostras clínicas com baciloscopia e cultura positivas, em 40 (63%) foi

isolado *M. tuberculosis*, em 15 (24%) MAC, e 8 (13%) outras micobactérias. Portanto, numa região onde 37% das amostras respiratórias positivas à baciloscopia são micobactérias não tuberculosas, a especificidade e o valor preditivo positivo deste teste podem estar comprometidos.

Greenbaum e colaboradores (1980) reportaram baciloscopia positiva em 52% dos pacientes com cavitações e 32% entre aqueles com infiltrados locais. Klein e colaboradores (1989) demonstraram que a sensibilidade da baciloscopia em pacientes com SIDA foi de 45% contra 81% no grupo controle sem SIDA. Tem sido reportado um menor rendimento da baciloscopia em pacientes infectados pelo HIV e espera-se que a sensibilidade seja menor quanto maior a imunodepressão (Klein *et al.*, 1989; Daniel, 1990). Smith e colaboradores (1994), no entanto, desafiam esse conceito, com resultados que mostram a mesma sensibilidade da baciloscopia para 100 infectados pelo HIV e 76 não infectados (60% e 57%, respectivamente).

Nas tabelas XII e XIII mostramos que 10 das baciloscopias diretas apresentaram resultado negativo. No grupo de pacientes, 34,3% (12/35) estavam em tratamento ou o receberam previamente, o que poderia estar contribuindo para uma baixa sensibilidade da baciloscopia.

A demonstração de BAAR pela microscopia direta no escarro é altamente sugestiva de tuberculose pulmonar, no entanto, a confirmação depende do cultivo do *M. tuberculosis* naquela amostra. Ambas as técnicas estão sujeitas a erro do tipo falso positivo ou falso negativo. Apesar da alta sensibilidade, a cultura pode não detectar até 20% dos bacilos em amostras de casos de tuberculose (Ling, 2008). Vários fatores podem estar relacionados com essa ocorrência, dentre eles podemos destacar amostras com menos de

10 a 100 bacilos/mL, que geralmente são negativas no cultivo. A descontaminação com soda pode inviabilizar o crescimento dos bacilos; a contaminação com fungos e bactérias de crescimento rápido, o uso prévio de drogas tuberculostáticas e problemas técnicos e operacionais também podem interferir no desempenho da cultura. De acordo com os nossos resultados, a sensibilidade da cultura considerando o total de amostras foi de 52,7% e segundo o diagnóstico clínico de TBP foi de 54,3%.

Em uma pesquisa realizada no setor de Microbiologia do Laboratório Central do HSP, Machado (1998) avaliou o desempenho do meio de cultura líquido (MGIT) e do meio sólido (LJ) e concluiu que a média de tempo para detecção de micobactérias em escarro utilizando MGIT foi significativamente menor quando comparada a do LJ, embora a sensibilidade e a especificidade fossem similares para ambos os testes.

A sensibilidade da cultura varia entre 80% e 100%, e a especificidade de 98% a 100% (Bollela, 1999). O cultivo do *M. tuberculosis* também pode ser afetado pela apresentação clínica da doença. Por outro lado, podemos ter resultados falsos-positivos na cultura, implicando em queda na especificidade da técnica. A ocorrência deste fato pode decorrer da contaminação da amostra com *M. tuberculosis*, manipulação indevida após a coleta, manuseio da amostra no laboratório ou por erro na identificação das amostras.

A leitura da cultura e o fornecimento dos resultados positivos devem ser efetuados semanalmente. Em razão do crescimento lento das micobactérias (geralmente em torno de 30 dias), a duração do processo desde o recebimento da amostra até o fornecimento do resultado positivo ou negativo da cultura efetuada com métodos tradicionais é de quatro a seis semanas e a

determinação da sensibilidade às drogas antituberculosas e ou a identificação da espécie isolada pode adicionar de três a oito semanas ao processo (Ministério da Saúde, 1994; Collins *et al.*, 1997).

Em nosso estudo, as 210 amostras foram submetidas à cultura, das quais 31 resultaram positivas, representando total de 15,3%. É importante ressaltar que dos 35 pacientes com TBP, 12 estavam usando drogas tuberculostáticas ou a usaram num intervalo curto de tempo antes da coleta das amostras clínicas. Além disso, 7 (3,3%) culturas estavam contaminadas, impedindo a sua avaliação adequada.

As técnicas convencionais e as alternativas discutidas mostraram grandes limitações para atingir o objetivo do diagnóstico rápido e preciso (Pfaller, 1994). Brisson-Nöel e colaboradores (1991) reportaram que em 514 amostras variadas (escarro, aspirado gástrico, líquido pleural, urina, líquido) 97,3% tiveram resultados de PCR concordantes com os dados microbiológicos e/ou clínicos. Os autores analisaram uma grande variedade de espécimes, mas não foi informado quais foram os critérios clínicos utilizados para a definição da tuberculose.

Clarridge III e colaboradores (1993) avaliaram 5000 espécimes clínicos diferentes quanto à presença de micobactérias usando como DNA alvo o elemento IS6110. Os resultados foram comparados com os da cultura resultando em sensibilidade de 83,5%, especificidade de 99% e valor preditivo positivo de 94,2%. A sensibilidade da PCR em amostras com baciloscopia negativa e cultura positiva foi de 62%. Outros trabalhos foram desenvolvidos, tendo como alvo o elemento IS6110 (Abe *et al.*, 1993; Forbes & Hicks, 1993; Miyazaki *et al.*, 1993; Nolte *et al.*, 1995; Beige *et al.*, 1995), sendo que a

sensibilidade da PCR oscilou entre 74 e 98%, e a especificidade entre 66 e 100%.

Na tentativa de otimizar os resultados da PCR, principalmente nas amostras paucibacilares, Forbes & Hicks (1994) descreveram a detecção de *M. tuberculosis* diretamente em meio de cultura 12B do BACTEC 460. Os resultados mostraram sensibilidade de 100% e especificidade de 99,7%. É importante ressaltar que 42% das culturas apresentaram resultados de baciloscopia negativo, mas apresentaram resultados positivos na PCR.

Sperhacker e colaboradores (2004) analisaram 80 amostras clínicas (pulmonares e extrapulmonares) usando PCR colorimétrico *in house* (PCR dot-blot). A detecção do produto amplificado foi feita por hibridização com sonda marcada com biotina em suporte sólido (membrana de nitrocelulose) e com a visualização do produto amplificado por migração em gel de agarose. Os autores consideraram como padrão ouro a cultura combinada com achados clínicos e verificaram sensibilidade de 90% e 95% para detecção em gel agarose e membrana, respectivamente e especificidade de 97% para ambas as formas de detecção. Assim, concluíram que os resultados de sensibilidade e especificidade obtidos com a PCR dot-blot justificavam estudos subsequentes de efetividade e posterior avaliação de sua real aplicabilidade na rotina de diagnóstico na rede de saúde pública.

A utilização de técnicas moleculares no diagnóstico da tuberculose tem atraído grande interesse, particularmente pela possibilidade de redução do tempo necessário para detecção e identificação do *M. tuberculosis* em espécimes clínicos. A disparidade entre o rendimento da baciloscopia e da cultura de escarro indica que o número considerável de diagnóstico potencial

de tuberculose, em amostras de escarro, não tem sido feito ou têm demorado em demasia, por falta de ensaios mais rápidos e sensíveis (Schluger, 1996).

O significado funcional das seqüências de DNA não é relevante para seu uso como alvo de amplificação na PCR, desde que seja específica do organismo que se pretende estudar. O elemento *IS6110* foi encontrado somente em bactérias do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* e *M. africanum*). Tanto *M. tuberculosis* quanto *M. bovis* podem causar tuberculose em humanos. No entanto, as rotas de infecção e a apresentação clínica geralmente são diferentes, sendo que a doença causada por *M. tuberculosis* é muito mais prevalente. *IS6110* tem uma única cópia na maioria das cepas de *M. bovis* e até 18 cópias em algumas cepas de *M. tuberculosis* (Van Soolingen *et al.*, 1993), porém raros isolados no sudeste asiático não possuem esta seqüência de inserção no seu genoma (Yuen *et al.*, 1993). Outros alvos de amplificação para PCR são possíveis e com vantagens teóricas. Tem sido comum o uso de seqüências de rRNA como alvo de amplificação podendo ser transcritas reversamente a um DNA como alvo da PCR (Böddinghaus *et al.*, 1990).

Um dos primeiros trabalhos sobre a aplicação da PCR no diagnóstico da tuberculose diretamente no escarro foi feito por Eisenach e colaboradores (1990), com a amplificação de um fragmento de 123 pares de bases da região *IS6110* em 162 amostras. A sensibilidade e especificidade encontradas foram de 96%. O trabalho demonstrou que a PCR foi capaz de diagnosticar efetivamente casos de tuberculose pulmonar, além da capacidade de diferenciar *M. tuberculosis* das micobactérias não tuberculosas. Uma limitação

deste trabalho foi não ter incluído grande número de amostras com baciloscopia negativa e cultura positiva.

Trabalhos publicados para analisar a sensibilidade a especificidade da PCR no diagnóstico de TBP foram elaborados a partir de amostras de pacientes com diagnóstico definido (Cheng *et al.*, 2004).

Recentemente, Scherer e colaboradores (2007) avaliaram o desempenho dessa PCR *in house* (PCR dot-blot) para diagnosticar TBP a partir de amostras de escarro com resultado de baciloscopia negativa em pacientes portadores do HIV e com alta suspeita de TBP, obtendo 90% de sensibilidade e 71% de especificidade. Os resultados encontrados por esses autores estão de acordo com a literatura, mostrando que os métodos moleculares podem contribuir de forma efetiva para o diagnóstico de TBP nestes pacientes.

Tanto Sperhake e colaboradores (2004) como Scherer e colaboradores (2007) avaliaram a eficácia da PCR *in house* tendo como foco a detecção dos produtos amplificados através de colorimetria em suporte sólido. No nosso trabalho, usando o mesmo protocolo de PCR *in house* padronizado por Sperhake, a detecção dos produtos amplificados foi feita em placa *amino link*, para avaliar sua aplicabilidade na rotina diagnóstica da rede de saúde pública. Este trabalho é o primeiro a apresentar a aplicabilidade do teste na rotina de um Hospital Geral Universitário.

Quando comparamos os resultados laboratoriais relacionados ao diagnóstico clínico verificamos que dos 111 (76,0%) pacientes com outro diagnóstico clínico (diferente de qualquer apresentação de TBP) 2 (0,01%) pacientes apresentaram resultado positivo na PCR colorimétrica da ANP sendo que nas baciloscopias e cultura os resultados foram negativos.

Por outro lado, 3 pacientes apresentaram resultado positivo na PCR colorimétrico do sedimento sendo que com os outros métodos o resultado foi negativo (Apêndice 4). Dois pacientes apresentaram resultado positivo na cultura com resultados negativos com os outros métodos utilizados. Dentre os grupos com diagnóstico de TBP associado ou não a outra doença, os resultados dos outros métodos aplicados nas amostras foram negativos nos pacientes nº 11, nº 30, nº 123 e nº 124 (Apêndices 1 e 2). Encontrou-se ainda resultados negativos com pelo menos um dos métodos, nos seguintes pacientes: nº 64, nº 94, nº 102, nº 104, nº 131 e nº 136 (Apêndices 1 e 2).

Resultados falso-positivos foram observados na seguinte proporção: 1,8% para a PCR colorimétrica da ANP e cultura e 2,7% na PCR colorimétrica do sedimento. Os resultados falso-negativos foram mais discrepantes em todos os métodos, como se segue: 68,6% na baciloscopia direta, 71,4% na PCR colorimétrica da ANP e do sedimento, 57,1% na baciloscopia do sedimento e 45,7% na cultura. Para evitar esses problemas vários autores recomendam monitorar as seguintes situações: a) inibição da Taq polimerase, b) distribuição não homogênea dos bacilos nas amostras paucibacilares, c) volume e quantidade dos espécimes analisados (Martins, 2000).

Saboor e colaboradores (1992) relataram resultados de PCR positivo para *M. tuberculosis* em pacientes com sarcoidose e salientaram que esta é uma doença granulomatosa de causa não definida, mas com características histológicas similares a da tuberculose. Mitchell e colaboradores (1992) em um estudo sobre detecção de rRNA de micobactérias em sarcoidose sugeriram que um agente micobacteriano poderia contribuir para a patogenia da doença.

Possíveis resultados falso-positivos já foram relatados por Reischl e colaboradores (1998) em amostras extrapulmonares de pacientes com suspeita de TB, porém com diagnóstico clínico de câncer e em pacientes que faziam uso de quimioterápicos. Outros autores também relataram resultados falso-positivos presentes em espécimes de biópsia de pulmão e linfonodos e aspirados provenientes de pacientes com leucemia, câncer ou pacientes imunocomprometidos (coinfectados com HIV, transplantados, e tratados com corticosteróides). Estes sítios como pulmão e linfonodos podem albergar *M. tuberculosis* na sua forma latente, onde a reativação e a replicação são favorecidas em pacientes com este perfil (Hellyer *et al.*, 1996; Honoré-Bouakline *et al.*, 2003).

As reações de PCR colorimétrica da ANP e do sedimento, apresentaram resultados positivos nas amostras de 10 pacientes (4,8% e 4,7, respectivamente). O teste apresentou sensibilidade de 28,6% [índice de confiança (IC)= 13,6-43,5], nas reações preparadas sobre ANP e sedimento. Com relação à especificidade apresentou melhor resolução [98,2%, IC= 95,6-100,7] nas reações realizadas com sedimento. Conclui-se que a PCR colorimétrica é pouco sensível, mas muito específica e tem acurácia de 81,3% e 80,8% para as reações sobre ANP e sedimento, respectivamente (Tabela XXVIII).

A estimativa de indivíduos realmente portadores de TBP, calculada pelo valor preditivo positivo foi de 83,3% (PCR colorimétrica de ANP) e 76,9% (PCR colorimétrica do sedimento) (IC= 54,0-104,4) e a estimativa de indivíduos realmente negativos foi calculada pelo valor preditivo negativo que resultou em 81,1% (IC=74,4-87,8), para a ANP e sedimento em ambos os cálculos.

A razão das probabilidades ou de verossimilhança (V_r) que indica a possibilidade do resultado do teste apresentar o resultado mais condizente com a verdade foi de V_r positivo=15,6 e 10,6, respectivamente para teste sobre ANP e sedimento. Quanto maior o valor de V_r positivo, maior a sua capacidade de diagnosticar a doença em pacientes com teste negativo, sendo considerado bons os valores superiores a 1,0, valores entre 1,0 e 0 diminuem a probabilidade da doença, e quanto mais próxima de zero for a V_r negativo para a presença do achado, mais forte o argumento contra a doença.

A fim de proporcionar dados mais substanciais sobre a validade diagnóstica de um teste, atualmente, recomenda-se que além dos valores de especificidade e sensibilidade, sejam calculados a razão de probabilidade (likelihood ratio) e as probabilidades pré e pós-teste. A razão de probabilidade indica o número de vezes que o exame é positivo entre portadores da doença em questão, em relação a falsos positivos. A probabilidade pré-teste estima a chance do exame ser positivo levando-se em consideração a prevalência. Considera-se dessa forma que quando o teste de PCR colorimétrica foi realizado com a ANP as chances de que um paciente com teste positivo, aumentou de 24,3% para 83,3,% (Figura 7).

Os índices de positividade do teste *in house* PCR colorimétrico foram menores para diagnóstico de TBP com respeito aos outros testes (cultura e baciloscopia) ($p=0,00$), conforme verificado pelo teste do X^2 (dados não mostrados). Uma vez que o valor de p não foi significativo o valor do coeficiente kappa, considerando o total de amostras clínicas apresentou boa concordância (kappa = 0,6 e 0,5 para PCR colorimétrica ANP e PCR colorimétrica do sedimento, respectivamente), mas quando calculamos a concordância do teste

com respeito ao diagnóstico clínico de TBP obteve-se fraca concordância. (coeficiente kappa = 0,41 e 0,33 para PCR colorimétrica ANP e PCR colorimétrica do sedimento, respectivamente).

Atualmente é possível adquirir kits comerciais, para realizar o diagnóstico de tuberculose pela técnica de PCR, no entanto o custo desses kits é elevado. A implementação da PCR *in house*, além de diminuir o custo, introduz o uso de novas tecnologias que possibilitam avanços no estudo das micobactérias, considerando as inúmeras aplicações que podem oferecer, como por exemplo, em estudos de susceptibilidade as drogas do *M. tuberculosis*, pesquisa epidemiológica e molecular de surtos, testes diagnósticos e avaliação da resposta ao tratamento, entre outras. Ainda, se considerarmos o custo da internação de um paciente sem diagnóstico e o risco de transmissão da doença, principalmente no ambiente hospitalar, a PCR terá boa relação custo-benefício se bem indicada (Bollela, 2000).

Kritski e colaboradores (1998) afirmaram que a interpretação clínica de um resultado de PCR positivo para TB no escarro, bem como a sua utilidade em outros tipos de espécimes clínicos ainda não estariam bem estabelecida. Se interpretarmos os resultados de acordo com a doença pré-teste os pacientes com elevada suspeita clínica de TBP, com baciloscopia direta negativa e teste PCR positivo, teriam indicação de início de terapia anti-TB, de isolamento respiratório (quando internados em hospital geral) e avaliação dos contatos intradomiciliares. Nos casos com baixa suspeita clínica de TBP, exame baciloscópico positivo e teste PCR negativo, deve-se realizar investigação maior na direção de uma micobactéria não tuberculosa.

Em 1998, Foulds e O'Brien pronunciaram-se no programa global de tuberculose da WHO com o objetivo de estimular e facilitar os estudos de novos testes para o diagnóstico da tuberculose. Como este programa enfatiza a implementação do diagnóstico da tuberculose paucibacilar. Martins e colaboradores (2000) sugeriram estudos regionais, em grupos específicos de pacientes, para definir as situações em que seria útil implantar a técnica de amplificação de ácidos nucleicos. Os laboratórios funcionariam como centros-pilotos e deveriam ser de nível II ou III, conforme indicado no "Workshop" relatado pela American Thoracic Society (1997). Estes deveriam possuir área exclusiva para os testes de amplificação de ácidos nucleicos e contar com profissionais para atuar na área de isolamento, identificação e teste de sensibilidade de micobactérias e outros profissionais para realizar os testes de amplificação de ácidos nucleicos.

De acordo com Bollela (2000), a PCR deve ser considerada e estaria indicada em algumas situações, tais como pacientes com forte suspeita de TBP em que foi preciso internação para confirmação diagnóstica, pacientes graves, especialmente com SIDA, com suspeita de tuberculose, pacientes paucibacilíferos em que se considere o início da terapêutica empírica, pacientes infectados pelo HIV, particularmente aqueles com níveis de células CD4⁺ menores que 100 células/mm³, em que, apesar da baciloscopia positiva, exista dúvida entre infecção por *M.tuberculosis* e /ou outras micobactérias.

É importante lembrar que a sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico não dependem da população, ou localidade em que o teste será utilizado, pois são características do teste. Se realizado conforme padronização, espera-se resultados reprodutíveis e constantes. No entanto, os

valores preditivos positivo e negativo são variáveis dependentes da prevalência da doença na população onde o teste será empregado. O conhecimento sobre essa questão é fundamental na avaliação de um teste que se pretenda implantar na rotina diagnóstica da doença (Arias *et al.*, 2007).

Quando se analisa um novo método, o desempenho do teste padrão é um parâmetro crítico. Para a detecção do *M. tuberculosis*, a cultura pode ser considerada o “gold standard”, por ter especificidade de 100% e sensibilidade de aproximadamente 90% (Bates, 1979). No entanto em nosso caso a sensibilidade da cultura foi de 54,3% e especificidade de 98,2% quando considerado o diagnóstico clínico. Este trabalho demonstrou que um teste de PCR colorimétrico foi capaz de detectar (em amostras clínicas pulmonares, em que poderiam estar presentes várias substâncias inibidoras da PCR) 28,6% das amostras com especificidade de 98,2% e 97,3% quando aplicado na ANP e sedimento, respectivamente.

As técnicas de PCR para diagnóstico de micobactérias se constituem em metodologias importantes para o diagnóstico da TBP, uma vez que os benefícios da rapidez com que podem identificar um caso justificam a sua implantação e uso rotineiro, associada aos métodos clássicos, em unidades com alta demanda e em pacientes com TBP de difícil diagnóstico.

Nossos resultados demonstraram que a técnica de PCR *in house* com detecção colorimétrica é importante como complemento para o diagnóstico da tuberculose, pois apresenta resultados de sensibilidade adequados quando comparados com a baciloscopia e/ou cultura e possibilita maior rapidez no resultado. Este teste poderia ser útil para implementar o diagnóstico rápido da tuberculose paucibacilar, que geralmente apresenta, baciloscopia negativa.

7. CONCLUSÕES

- O teste *in house* de PCR colorimétrico apresentou uma boa concordância com os métodos de bacterioscopia e cultura utilizados na rotina laboratorial em um Hospital Geral Universitário para o diagnóstico de TBP, com baixa sensibilidade e alta especificidade;
- O teste *in house* de PCR colorimétrico em relação ao diagnóstico clínico evidenciou boa acurácia, elevados valores preditivos (positivo e negativo) e alta probabilidade positiva pós-teste.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, C.; Hirano, K.; Wada, M.; Kazumi, Y.; Takahashi, M.; Fukasawa, Y.; Yoshimura, T.; Miyagi, C.; Goto, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polimerase chain reaction and Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. J. Clin. Microbiol. 1993, 31(12):3270-3274.

Almeda, J.; Garcia, A. Gonzáles, J. Quinto, L. Ventura, P.J.; Vidal, R.; Rufi, G.; Martinez, J.A.; Jimenez de Anta, M.T.; Trilla, A.; Alonso, P. L. Clinical evaluation of na in house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. Eur. J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis. 2000, 19(11):859-867.

Al-Soud, W.A. & Rädström, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory componets in blood cell. J. Clin. Microbiol. 39:485-493.

Agrestil, A. (2002). Categorical Data Analysis. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons.

AL Zahrani, K.; AL Jahdali, H.; Poirier, L.L.; René, P.; Gennaro, M.L.; Menzies, D. Accuracy and utility of commercially available amplification and serologic test for the diagnosis of minimal pulmonary tuberculosis. Am. J. Resp. Crit. Care Med.2000; 162:1323-9.

American Thoracic Society Workshop. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? Am. J. Crit. Care Med. 1997, 155:1804-1814.

Anderson, C.; Inhaber, N.; Menzies, D. Comparison of sputum induction with fiber-optic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1995,152(Pt 1): 1570-1574.

Arias, M.; Mello, F.C.Q.; Pavón, A.; Marsico, A.G.; Alvarado-Gálvez, C.; Rosales, S.; Pessoa, C.L.C.; Pérez, M.; Andrade, M.K.; Kritski, A.L.; Fonseca, L.; Chaisson, R.; Kimerling, M.; Dorman, S. Clinical Evaluation of the Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for Detection of Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 1007, 44:674-680.

Arriaza BT., Salo W., Aufderheide A.C., Holcomb T.A.. Pré-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1995; 98(1):37-45.

Bates, J.H. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clin. Chest Med.* 1980, 1:167-174.

Behr, M.A.; Warren, S.A.; Salamon, H. et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smears-negative for acid-fast bacilli. *Lancet.* 1999, 353:444-449.

Beige, J. Lokies, J.; Schaberg, T.; Finckh, U.; Fischer, M.; Mauch, H.; Lode, H.; Köhler, B.; Rolfs, A. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33(1): 90-95.

Boddinghaus, B.; Wichelhaus, T.A.; Brade, V.; Bittner, T. Removal of PCR inhibitors by silica membranes: Evaluating the Amplicor Mycobacterium tuberculosis Kit. J. Clin. Microbiol. 2001, 39: 3750-3752.

Bollela, V. R.; Sato, D.N.; Fonseca, B. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. Rev. de Saúde Públ. 1999, 33(3): 281-286.

Bollela V.R. Avaliação da PCR no diagnóstico rápido da tuberculose pulmonar em Ribeirão Preto. Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Medicina. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2000.

Brasil. Ministério da Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. Manual de Normas para o Controle da Tuberculose. 4º Ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 1995.

Brisso-Nöel, A.; Aznar, C.; Chureau, C.; Nguyen, S.; Pierre, C.; Bartoli, M.; Bonete, R.; Pialoux, G.; Gicquel, B.; Garrigue, G. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet. 1991, 338(8763):364-366.

Centers for Disease Control and Prevention. Nucleic acid amplification test for tuberculosis notice to readers. Morb. Mortal. Wkly Rep. 1996; 45(43):950-951.

Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS. MMWR, 1992, 41:1-19.

Centro de Vigilância Epidemiológica. “Algumas considerações sobre a situação da Tuberculose no Estado de São Paulo”. Caderno informativo da Divisão de Tuberculose do Estado de São Paulo emitido no Dia mundial da Tuberculose, 2006.

Chakravorry, S.; Dudeja, M.; Hanif,M.;Tyagi, J.S. Utility of universal sample processing methodology, combinig smear microscopy, cultura, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. J. Clin. Microb. June,2005, 2703-08.

Cheng, V. C. C.; Yam, W. C.; Hung, I. F. N.; Woo, P. C. Y.; Lau, S. K. P.; Tang, B. S. F.; Yuen, K. Y. Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Pathol. 2004;57:281–285.

Chimarra, E.; Ferrazoli, L.; Vekisyn; Martins, M.C.; Durhan, A.; Arbeit, R.; Leão, S.C. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-Restriction enzyme analysis (PRA) in reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. BMC Microbiology. 2008, 8:48.

Clarridge, J.E.III; Shawar, R.M.; Shinnick, T.M. and Plikaytis, B.B. Large-Scale use of polymerase chain reaction of Mycobacterium tuberculosis in a routine mycobacteriology laboratory. J. Clin. Microbiol. 1993, 31:2049-2056.

Collins, CH; Grange, JM; Yates, MD. Tuberculosis bacteriology: organization and practice. Butterworth. 1997.

Conde M.B.; Soares, S.L.M.; Mello, F.C.Q.; Resende, V.M.; Almeida, LL.; Reingold, A.L.; Daley, C.L.; Kritski, A.L. Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2000, 162:2238-2240.

Cosmotock G.W. Epidemiology of tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 1982; 125:8-16.

Daniel, TM. The rapid diagnosis of tuberculosis: A selective review. J. Lab. Clin. Méd. 1990, 116(3):277-282.

Daniel, T.M. & Debanne, S.M. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. Am. Rev. Resp. Dis. 1987, 135:1137-1151.

Eisenach, K.D.; Cave, M.D.; Bates, J.H.; Crawford, J.T. Polymerase chain reaction amplification of repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis. 1990, 161:977-981.

Ellner, JJ; Hinman, AR; Dooley, SW; Fischl, MA; Sepkowitz, KA; Goldberg; MJ; Shinnick, TM; Iseman, MD; Jacobs Junior, WR. Tuberculosis Symposium: Emerging problems and promise. J. Infect. Dis. 1993. 168: 537-551.

Flores,L.L;Pai,M.; Colford,J.M. Jr.; Riley, L.W. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. BMC Microbiol. 2005, 5:55.

Fodor, T. Detection of mycobacteria in sputum smears prepared by cytocentrifugation and sedimentation Tubercle and Lung Disease. 1995, 76(3): 273-274.

Forbes, B.A. & Hicks, K.E. Ability of PCR assay to identify *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC 12B vials. J. Clin. Microbiol. 1994,32(7):1725-1728.

Foulds, J.; O'Brien, R.- New tools for the diagnosis of tuberculosis: the perspective of developing countries. Int. J. Tuber. Lung Dis. 1998, 2:778-783.

Fraser, R; Pare, JAP; Pare, PD; Fraser, RS; Genereux, GP. The pleura. In: Fraser, GP. Diagnosis of diseases of the chest. 3rd. Ed. Philadelphia, WB Saunders, 1991.

Gordin,FM; Slutkin, G. The validity of acid-fast smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Arch. Pathol. Lab. Méd. 1990,114:1025-1027.

Greenbaum , M; Beyt, BE; Murray, PR;. The accuracy of diagnosing tuberculosis at a large teaching hospital. Am. Ver. Resp. Dis. 1980, 121:477-481.

Greenhalg, T. How to read a paper: papers that report diagnostic or screening tests. *British Medical Journal*. 1997, 315:540-543.

Guerrero, C; Bernasconi, C.; Burki, D; Bodner, T; Telenti, A;. A novel insertion element from *Mycobacterium avium* IS 1245, is a specific target for analysis of sytrain relatedness. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:304-307.

Hanna , B.A; Ebrahinzadeh, A.; Elliot, L.B.; Morgan, M.A.; Novak, S. M.; Ruschgerdes, S.; Acio, M. Dumbar, D.F.; Holmer, T.M.; Rexer, C.H.; Savthyakumar, C.; Vannier, A.M. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of micobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37:348-752.

Hellyer, T.J.; Desjardin, L.E.; Assaf, M.K.; Bates, J.H.; Cave, M.D.; Eisenach, K.D. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34(11):2843-2846.

Hermans P W., Dick van Soolingen, M. Dale, J W. Schuitema, A R. J.. McAdam, R A Catty, D;. van Embden J D. A Insertion Element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*:a Useful Tool for Diagnosis and Epidemiology of Tuberculosis. *J.Clin. Microbiol.*, Sept. 1990: 2051-2058.

Holden, M.; Dubin, M.R.; Diamont, P.H. Frequency of negative intermediate-strength tuberculin sensitivity in patients with active tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 1971, 285:1506-1509.

Honoré-Bouakline, S.; Vincensini, J.P; Giacuzzo, V.; Lagrange, P.H.; Hermann, J.L. Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of Sample Preparation and DNA extraction. J. Clin. Microbiol. 2003, 41(6):2323-2329.

Jones, BE; Young, SMM; Atoniskis, D; Davidson, PT; Kramer, F; Barnes, PF. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. Am. Rev. Resp. Dis. 1993, 148:1292-1297.

Kato-Maeda M., Bifani P.J., Kreiswirth B.N., Small P.M. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Invest. 2001; 107(5):533-537.

Katoch, V.M. Newer diagnostic technique for tuberculosis. Indian J. Med. Res. 2004, 120:418-428.

Kim, TC; Blackman, RS; Heatwole, AM. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with tuberculosis: prevalence and significance of negative smears pre-treatment and positive smears post-treatment. Am. Ver. Resp. Dis. 1984, 129:264-270.

Kirschner, P; Böttger, EC. Headaches for taxonomists: the *M. avium* - *M. intracellulare* complex. (letter to the Editor). Int. J. Syst. Bacteriol.1992, 42:335-336.

Kivihya-Ndugga, L.; van Cleeff, M.; Juma E.; Kimwomi, J.; et al.- Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of Tuberculosis in a population high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol. 2004,42(3):1012-1015.

Klein, NC; Duhcanson, FP; Lenox, TH; Pitta, A; Cohen, SC; Wormser, GP. Use of mycobacterial smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in AIDS/ARC patients. Chest. 1989, 95:1190-1192.

Kramer, F; Modilevsky, T; Walianny, AR; Leedom, JM; Barnes, PF. Delayed diagnosis of tuberculosis in patients with human immunodeficiency vírus infection. Am. J. Méd.1990, 89:541-556.

Kritski, A.L.; Conde, M.B.; Jamal,L. Tuberculose e infecção pelo HIV: aspectos atuais sobre diagnóstico, tratamento e prevenção. Boletim de Pneumonia Sanitária. 1998, 6(2):53-61.

Kritski, A.L.; Conde, M.B.; Muzy de Souza, G.R. Tuberculose. Do ambulatório a enfermaria. 2º edição. São Paulo. Atheneu, 2000.

Kusunoki, S; Ezaki, T;Tamesada, M; Hatanaka, Y; Asano, K; Hashimoto, Y; Yabuuchi, E. Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. J. Clin. Microbiol. 1991, 9:1596-1603.

Levy, H; Feldman, C; Sacho, H; van der Meulen, H; Kallenbach, J; Koornhof, H. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest*. 1989, 95:1193-1197.

Ling, D.I.; Flores, L.L.; Riley, L.W.; Pai, M. Commercial Nucleic-Acid amplification test for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One*. 2008, 3(2):e1536: 1-11.

Machado, M.A.O. Avaliação do meio de cultura líquido BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) em rotina de detecção de micobactérias em amostras de escarro de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar. 1998, Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Medicina.

Martins, M.C. Estudo crítico da utilização das técnicas de Biologia Molecular na detecção e identificação de micobactérias, em especial, *Mycobacterium tuberculosis*.- Dissertação apresentada ao departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre, 2000.

Martins, MC; Ueki, SYM; Palhares, MCA; Hadad, DJ; Telle, MAS; Placco, ALN et al.. An alternative biphasic culture system for recovery mycobacteria from blood specimens. *Rev. Microbiol*. 1997, 28:183-189.

Mattos IG, Ribeiro MO, Netto IC, d'Azevedo PA. Tuberculosis: a study of 111 cases in an area of high prevalence in the extreme south of Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2006 Jun;10(3):194-8.

Mejia, G.I.;Castrillon, L.; Trujillo, H.; Robledo, J.A. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*1999, 3(2):138-142.

Mello,F.C.Q.;Fonseca-Costa, J.; Fávero, A.L.; Oliveira, M.M.;Baptista, R.L.R; Kritski, A.L. *et al.* Evaluation of an amplification test-AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) test-Roche Molecular System-for the diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis (SNPT) at a teaching hospital, in Rio de Janeiro.*Am.J.Resp. Crit. Care Med.* 2002, 165:A628.

Miliner, R.A, Stottmeier, K.D, Kubica, G.P. Formaldehyde: a photothermal activated toxic substance produced in Middlebrook 7H10 medium. *Am Rev Respir Dis.* 1969, 99(4):603-607.

Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária e Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia I Consenso Brasileiro de Tuberculose-1997. *J. Penumol.* 1997, 6:1-346.

Ministério das Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de bacteriologia da tuberculose. 2ª. Ed. Rio de Janeiro, 1994.

Parra, C.A.; Londoño, L.P.; Del Portillo, P.; Patarroyo, M.E. Isolation, characterization and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: identification of a species-specific sequence. *Infect. Immun.* 1991, 59:3411-3417.

Pfaller, MA. Application of new technology to the detection identification and antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994, 101:329-337.

Piersimoni C. & Scarparo C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41(120):5355-5365.

Pitchenik, AE & Rubinson, HÁ. The radiographic appearance of tuberculosis in patients with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and pré-AIDS. *Am. Ver. Resp. Dis.* 1985, 131:393-396.

Reischel, U.; Lehn, N.; Wolf, H.; Naumann, L. Clinical Evaluation of the Automated Cobas Amplicor MTB Assay for testing Respiratory and Nonrespiratory Specimes. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36(10): 2853-2860.

Rosemberg, J. Tuberculose - aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Boletim de Pneumologia Sanitária.* 1999, 7(2):.5-27.

Rossetti, MLR; Jardim, SB; Rodrigues, VFS; Moura, AR; Oliveira, H; Zaha, A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. J. Microbiol. Methods. 1997, 28:139-146.

Saboor, S.S.; Johnson, N.M.; McFadden, J.-Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with PCR. Lancet. 1992, 339:1012-1015.

Scherer, L.C.; Sperhacker, R.D.; Jarczewski, C.; Cafrune, P.I.; Minghelli, S.; Ribeiro, M.O.; Mello, F.C.Q.; Ruffino-Neto, A.; Kritski, A.L. PCR colorimetric dot-blot assay and clinical pretest probability for diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Smear-Negative patients. BMC Public Health. 2007, 7:1-10.

Schluger, N.W; Kinney, D; Rom, W.N. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. Chest. 1994, 105:1116-1121.

Schluger, N.W. The polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis. In: ROM, W.N. GAray, S. Tuberculosis, 1st. ed. New York: Little, Brown and Company. 1996, 233-239.

Schluger, N.W. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2001, 164(11):2020-2024.

Shikama, ML; Aily, D.; Pedro, H.; Márquez, R.; Kimura, R.; Coelho, A. *et al.* Micobactérias não tuberculosas (MNT): a importância da agilização de sua

identificação. Resumo do 3° Encontro do Instituto Adolfo Lutz., out.18-21, 1999 São Paulo, Brasil, 175.

Smith, R.L.; Yew, K.; Berowits, K.A.; Aranda, C.P.. Factors affecting the yield of acid-fast sputum smears in patients with HIV and tuberculosis. *Chest*. 1994, 106:684-686.

Soini, H.; Agha, S.A.; El-Fiky, A.; Viljanen, M. K. Comparison of amplicor and 32-kilodalton PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34(7):1829-1830.

Somoskovi, A.; Song, Q.; Mester, J.M.; Tanner, C.; Hale, Y.; Parsons, L.; Salfinger, M. Use of molecular methods to identify the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and other mycobacterial species and to detect rifampin with the BACTEC MGIT 960 system. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41(7):2822-2826.

Souza, W.V.; Albuquerque, M.F.M.; Barcellos, C.C.; Ximenes, R.A. de A.; Carvalho M.S. Tuberculose no Brasil: construção de um sistema de vigilância de base territorial. *Rev. Saúde Pública*. 2005. 39(1):82-89.

Sperhacker, R.D Padronização e validação de um método de diagnóstico colorimétrico para tuberculose. Tese apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil para obtenção do título de Doutor. 2003.

Sperhacker, R.D.; Mello, F.C.Q.; Zaha, A.; Kritski, A.L.; Rossetti, M.L.R. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2004, 8(3): 312-317.

Springer, B; Stockman, L.; Teschner, K.; Roberts, GD.; Böttger, EC. Two laboratory collaborative study on identification of Mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. J. Clin. Microbiol. 1996, 296-303.

Suzuki, K.; Okamoto, N.; Watanabe, S.; Kano, T. Chemiluminiscent microliter method for detecting PCR amplified HIV-1 DNA. J. Virol. Meth. 1992, 38:113-122.

Takewaki, S.; Okuzumi, S.K.; Ishiko, H.; Nakamura, K.; Ohkubo, A.; Nagai, R. Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and species specific oligonucleotide probes. J. Clin. Microbiol. 1993, 43(2):446-450.

Thierry, D.; Cave, M.D.; Eisenach, K.D.; Crawford, J.T.; Bates, J.H.; Gicquel, B.; Guesdon, J.L. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucl. Acids. Res. 1990, 18:188.

Van Soolingen, D.; Hass, P.E. W.; Hermans, P.W.M.; Groenen, P. M. A.; Van Embden, J.D.A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strains differentiations and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1993, 1987-1995.

Wayne, LG; Engeback, HC; Engel, HWB; Froman, S; Gross, W; Hawkins, J et al. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for pigment, urease, resistance to sodiumchloride, hydrolysis of Tween 80, and b-galactosidase. Int. J. Syst. Bacteriol. 1974. 24:412-419.

Wayne, LG; Engel, HWB; Grassi, C; Gross, W; Hawkins, J; Jenkins, PA et al. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for niacin and catalase and for to isoniazid, thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, hydroxylamine and p-nitrobenzoate. Int. J. Syst. Bacteriol. 1976, 26:311-318.

Wayne, L.G. & Kubica, G.P. Genus *Mycobacteria*. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (Eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2.9th ed. Baltimore: Williams&Wilkins, 1986,1436-1457.

Whalen, C; Horsburgh, CR; Hom, D; Lahart, C; Simberkoff, M; Ellner, J. Accelerated course of human immunodeficiency vorus infection after tuberculosis. Am. J. Resp. Crit. Care Méd.1995, 51:1029-1035.

Wisnivesky, J.P.; Serebrisky, D; Moore, C.; Sacks, H.;Iannuzzi,M.C.; McGinn,T. Validity of clinical prediction rules for isolating inpatients with suspected tuberculosis. J. Gen. Inter. Med. 2005, 20:947-952.

Wobeser,, WL; Kraiden, M; Conly, J; Simpson, H; Yim, B; D'Costa, M; Fuksa, M; Hian-Cheong, C; Patterson, M; Phillips, A; Bannatyne, R; Haddad, A; Brunton, JL; Kradjen, S. Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol.1996, 34(1):134-139.

World Health Organization. Global Tuberculosis Control. World Health Report. Geneva, Switzerland: 2002.

World Health Organization. Global Tuberculosis Control. World Health Report. Geneva, Switzerland: 2006.

World Health Organization. Global Tuberculosis Control. World Health Report. Geneva, Switzerland: 2008.

Wolinsky, E. Convencional diagnostic methods for tuberculosis. Clin. Infect. Dis. 1994, 19: 396-401.

Yuen, L.K.W.; Ross, B.C.; Jackson, K.M.; Dwyer, B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* from Vietnamese patients by Souther blot hybridization. J. Clin. Microbiol. 1993, 31(6):1615-1618.

Bibliografia Consultada

Duarte, R.S. Tuberculose: antigo problema e novos desafios. Aula ministrada no 6/6/2007. Dpto. Microbiologia Médica. IMPPG/UFRJ.

Informações do Relatório do PNCT, SVS, MS, 2002.

http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21446

Manual del Programa para Capacitación de Laboratórios, México 2000

II Consenso Brasileiro de Tuberculose, Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. Jornal Brasileiro de Pneumologia; 30(1), S- 62 junho de 2004.

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Programa Nacional de controle de Tuberculose. Situação da Tuberculose, Avanços e Desafios, 2005. Brasília, 2005.

<http://www.vademecum.com.br/iatros/index.htm>.

Programa para Capacitación de Laboratórios, México 2000, manual de contenido técnico desarrollado por Laszlo, A.; Barrera, L.; Balandrano, S.; Ridderhof, J.; Smithwick, R.; Shah, K.

9. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo Clínico



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Hospital São Paulo
Ficha de Acompanhamento / TB



Paciente:		RH:	
Sexo: M F	Idade: anos	Enfermaria:	
Admissão no PS:	Horário:	Transferência: local ?	
amostras colhidas			
1ª fonte	Data solicitação:	Data coleta:	Data resultado:
BAAR: (+) (-)	Cultura: (+) (-)	identificação	
2ª fonte	Data solicitação:	Data coleta:	Data resultado:
BAAR: (+) (-)	Cultura: (+) (-)	identificação	
3ª fonte	Data solicitação:	Data coleta:	Data resultado:
BAAR: (+) (-)	Cultura: (+) (-)	identificação	
Isolamento respiratório	0 1 9		
Início da terapêutica:	/ /	Drogas:	
Co-morbidades e hábitos: 0 1 9			
Etilismo	0 1 9	Tabagismo	0 1 9
UDEV	0 1 9	Corticoterapia imunossupresora	0 1 9
HIV colhido (0 1 9)	Positivo (0 1 9)	em / /	Uso ARV (0 1 9)
Quais:			
CD4:	em / /	CV:	ou Log em / /
Doença oportunistas associada ao HIV:			
Queixa principal:		e tempo em semanas	
Tosse	0 1 9	Febre	0 1 9
Expectoração	0 1 9	Sudorese noturna	0 1 9
Hemoptise	0 1 9	Cefaléia	0 1 9
Emagrecimento	0 1 9	Confusão	0 1 9
Dispnéia	0 1 9	Adenomegalia	0 1 9
PPD realizado	0 1 9	Se realizado:	mm
Forma Clínica			
Disseminada	0 1 9	Pulmonar bacilífera	0 1 9
Uro-genital	0 1 9	SNC	0 1 9
Ganglionar	0 1 9	Pleural	0 1 9
Pulmonar miliar	0 1 9	HMC	0 1 9
		Pulmonar não bacilífera	0 1 9
		Óssea	0 1 9
		Articular	0 1 9
		Outra	0 1 9
Diagnóstico:			
Baciloscopia	0 1 9	Baciloscopia e Cultura	0 1 9
Cultura	0 1 9	Clínico - tto de prova	0 1 9
QC / imagem	0 1 9	Anátomo patológico	0 1 9
		Exames / imagem	0 1 9
RX:			
Normal	0 1 9		
Caverna	0 1 9		
Padrão Típico		Padrão Atípico	Padrão Compatível
Anátomo - Patológico: 0 1 9			
Inflamatório inespecífico	0 1 9	Granuloma sem necrose caseosa	0 1 9
Granuloma com necrose caseosa	0 1 9	Outro	
Evento atual:			
Primeiro episódio	0 1 9	Falha terap.	0 1 9
qdo	qdo	Tto após abandono	0 1 9
		Novo episódio	0 1 9
		Qdo	
Complicações durante a internação: descrever			
Data da Alta:	Óbito: 0 1	Data do óbito:	/ /
Preenchido por:		Data:	/ /
Observação	0 sim	1 não	9 ignorado

Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 19 de novembro de 2004.
CEP 1425/04

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) MARTHA GABRIELA CELLE RIVERO
Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Padronização e avaliação da polimerase chain reaction (PCR) colorimétrico para diagnóstico de tuberculose”**.

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **18/maio/2005**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **14/novembro/2005**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

“Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa.”

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

Anexo 3. Protocolo e POP do Setor de Micobactérias da Seção de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital São Paulo – HSP

BACILOSCOPIA

Princípio da Metodologia

As micobactérias possuem uma parede celular constituída de ácidos micólicos resistentes à descoloração por álcool-ácido, elas possuem uma notável propriedade: dificilmente tomam os corantes básicos de anilina, mas, uma vez coradas, fixam-nos de tal forma que não se descoram pela ação diferenciadora do álcool-ácido (álcool e ácidos numerais fortes diluídos). Essa é a propriedade que se conhece por álcool-ácido resistente.

Essa coloração é o método mais rápido para a detecção de micobactérias em amostras clínicas.

Tipo de amostras

As amostras são obtidas de material orgânico do trato respiratório inferior, tecidos, líquidos em geral, fezes, linfa de lóbulo de orelha, mucosa nasal, lavado gástrico, escarro, líquidos orgânicos, biópsias de tecidos e urina.

Rejeição

Frasco com salivas.

Liberação do resultado:

Resultado negativo: não foram observados bacilos álcool-ácido resistentes na amostra analisada. Reportar: Pesquisa de BAAR negativa.

Resultado positivo: presença de bacilos álcool-ácido resistentes na amostra analisada. (consultar Tabela 1).

Tabela 1. Guia para liberação do resultado pela Coloração Ziehl-Neelsen.

Ziehl-Neelsen	Resultado
0/100 campos	Não foram encontrados BAAR em 100 campos observados.
menos de 1 bacilo/100 campos	+ Presença de menos de 1 BAAR em 100 campos observados.
1 a 10 bacilos/50 campos	++ Presença de 1 a 10 BAAR em 50 campos observados.
Mais de 10 bacilos/20 campos	+++ Presença de mais de 10 BAAR em 20 campos observados.

PETROFF

Princípio do Teste

A digestão do material permite a concentração do BAAR por sedimentação e a descontaminação permite o crescimento sem alteração do pH do meio.

Critérios de Rejeição da Amostra:

Escarro saliva ou em temperatura ambiente por mais de 6 horas.

Urina urina de 24 horas ou em temperatura ambiente por mais de 6 horas.

Biópsia em formol ou em temperatura ambiente por mais de 6 horas.

- Lavado brônquico alveolar □ em temperatura ambiente por mais de 6 horas.
Líquidos orgânicos □ em temperatura ambiente por mais de 6 horas.
Secreções em geral □ em temperatura ambiente por mais de 6 horas.
Secreções em culturete.
Líquidos orgânicos, sangue e medula óssea □ em frasco Bactec de aeróbio ou anaeróbio.

CULTURA E IDENTIFICAÇÃO (NIACINA)

Procedimento (passo a passo):

- Os frascos de meio LJ ficam na estufa por 8 semanas e as leituras são feitas uma vez por semana até completar 2 meses.
- **Observar se tem crescimento, caso tenha, separar para identificação e repicar.**
- Fazer uma lâmina de Ziehl Neelsen da colônia para observar se é bacilo álcool ácido resistente.
- Crescimento sugestivo de micobactéria: colônia bege à palha e com tempo de crescimento à partir de 3 semanas.

Fazer o teste de niacina:

Procedimento:

- a) adicionar 1mL de água destilada estéril no tubo de LJ com 4 semanas de crescimento, fazendo alguns cortes no meio com auxílio da alça, a fim de favorecer a liberação da niacina;
- b) deixar o tubo em posição horizontal durante 10 minutos, e após este período, transferir 0,6 mL, desta solução (procure não aspirar colônia) para um tubo com tampa de rosca, de 90x120 mm;
- c) introduzir a fita de niacina na suspensão, com a parte plástica para cima. Agitar suavemente o tubo na vertical, mantendo-o nesta posição durante 20 minutos;
- d) realizar a leitura, observando a mudança de coloração na suspensão: o aparecimento de coloração amarela indicará teste positivo (fazer juntamente com o teste um controle positivo e um negativo: para o controle negativo ATCC *M. bovis*; para o controle positivo usar a cepa ATCC 25177 *M. tuberculosis*);
- e) o teste de niacina deve ser realizado em tubo hermeticamente fechado, a fim de evitar a saída de cloreto cianogênico, que é um gás volátil e constitui um dos principais elementos da reação.

Leitura do teste da niacina:

Depois do tempo esperado, realizar a leitura, observando a mudança de coloração na suspensão. O aparecimento de coloração amarela indica teste POSITIVO, e transparente NEGATIVO.

Teste Positivo: *Mycobacterium tuberculosis*

Teste Negativo: Micobactérias não complexo *M. Tuberculosis*.

10. APÊNDICES

Apêndice 1. Grupo de pacientes com diagnóstico clínico de TBP sem associação a outras doenças

Paciente	Baciloscopia direta	colorimétrico ANP	Baciloscopia sedimento	colorimétrico do sedimento	Cultura	Dx.TBP	TBPHIV+/-	Dx.clínico	Tratamento prévio
4	0	0	0	0	0	0	4	TBP	1
8	0	0	0	0	0	0	4	TBP	1
20	1	0	0	0	0	0	4	TBP	1
30	1	1	1	1	1	0	4	TBP	1
64	1	1	0	1	0	0	4	TBP	1
65	0	0	0	0	0	0	4	TBP(reativada)	0
94	1	0	1	1	0	0	4	TBP	1
102	1	1	0	0	0	0	4	TBP	1
104	0	0	0	1	0	0	4	TBP	1
124	1	1	1	1	1	0	4	TBP(reativada)	0
131	1	1	0	1	0	0	4	TBP tratada há 3 meses	0
136	0	1	1	1	1	0	4	TBP(reativada)	0

0: resultado positivo; 1: resultado negativo; 4: diagnóstico clínico de TBP

- nº 30 e nº 124, que de acordo com a ficha clínica tiveram antecedente de TBP tratada em 1998 e 2003, respectivamente.

Apêndice 2. Grupo de pacientes com diagnóstico clínico de TBP associado a outras doenças

Paciente	Baciloscopia direta	colorimétrico ANP	Baciloscopia sedimento	colorimétrico do sedimento	Cultura	Dx.TBP	TBPHIV+/-	Dx.clínico	Tratamento prévio
11	1	1	1	1	1	0	2	TBP+DPOC	1
28	0	1	0	1	0	0	2	TBP \neoplasia pancreas	1
33	0	0	0	0	0	0	2	TBP/DPOC/Pneumonia	1
84	1	0	1	0	1	0	2	TBP/pancreatite crônica/diabetes	1
123	1	1	1	1	1	0	2	TBP /linfoma de hodgkin	0
139	0	1	0	0	0	0	2	TBP/ TBganglionar	1

0: resultado positivo; 1: resultado negativo; 2: diagnóstico clínico de TBP associado a outras doenças

- o paciente nº 11, diagnosticado como DPOC e seqüela de TBP (primeiro episódio em 1992);
- o paciente nº28 apresentou resultado da PCR colorimétrica (ANP e sedimento) mas com cultura positiva que foi identificada com *Mycobacterium fortuitum*. No momento da internação apresentava tosse, dispnéia e adenomegalia. O Rx de tórax demonstrou infiltrado intersticial nodular difuso e pneumotórax; com o suporte de exames específicos foi diagnosticado como sepse grave, pneumonia hospitalar e TBP;
- o paciente nº 84, gênero masculino, de 52 anos, etilista, tabagista foi internado por apresentar tosse, expectoração emagrecimento, dispnéia e febre. O Rx de tórax revelou grande cavitação, sugestiva de TBP, foi diagnosticado como portador de pancreatite, diabetes e TBP;

- o paciente nº123, diagnosticado com Linfoma de Hodgkin e com início de tratamento para TB em agosto de 2005 sendo que foi incluído no estudo na internação de setembro 2005;
- o paciente 139 foi internado por apresentar emagrecimento, dispnéia, febre, sudorese noturna, cefaléia e adenomegalia cervical. O Rx de tórax mostrou alargamento mediastinal e infiltrado pulmonar reticular difuso. Foi solicitada biópsia de gânglio cervical, que foi positiva para presença de BAAR; para amostra de escarro só a PCR colorimétrica da ANP apresentou resultado negativo;

Apêndice 3. Grupo de pacientes com diagnóstico clínico de TBP associado à infecção pelo HIV

Paciente	Baciloscopia direta	colorimétrico ANP	Baciloscopia sedimento	colorimétrico do sedimento	Cultura	Dx. TBP	TBPHIV +/-	Dx.clinico	Tratamento prévio
12	1	1	1	1	1	0	3	TBP/SIDA	1
15	1	1	1	1	1	0	3	TBP/SIDA	1
40	1	1	1	1	1	0	3	SIDA/TBP /Pneumonia	0
49	0	0	0	0	0	0	3	TBP/TB ganglionar/SIDA	1
60	1	1	0	1	0	0	3	TBP/SIDA/HCV	1
66	1	1	1	1	1	0	3	TBP/SIDA	0
68	1	1	1	1	0	0	3	SIDA/TBP/pneumonia	0
69	0	0	0	0	0	0	3	SIDA/TBP	1
71	1	1	1	1	1	0	3	SIDA/TBP	1
80	1	1	1	1	1	0	3	SIDA/TBP	1
101	1	1	1	1	0	0	3	SIDA/TBP	0
109	1	1	1	1	1	0	3	SIDA/TBP /Meningite	0
111	1	1	1	1	1	0	3	SIDA/HCV/HTLV/TBP em tratamento	0
121	1	1	1	1	1	0	3	SIDA/TBP	0
128	1	1	1	1	0	0	3	SIDA/TBP/TB gnglionar	1
143	1	1	1	1	1	0	3	SIDA/HBVC/TBP	1
147	0	1	0	1	0	0	3	SIDA/TBP	1

0: resultado positivo; 1: resultado negativo; 3: diagnóstico clínico de TBP + HIV

- os pacientes nº 12, nº 15, nº 40, nº 66, nº 71, nº 80, nº 109, nº 111, nº 121, nº 143 constituem um grupo que têm em comum serem portadores de HIV, apresentarem no momento da internação outras infecções e TBP diagnosticada. Alguns dos casos tiveram tratamento interrompido por complicações hepáticas;
- e os pacientes nº 60, nº 68, nº 101, nº 128, nº 147 que têm em comum serem portadores do HIV com diagnóstico anterior de TBP e que quando foram internados apresentavam outra infecção concomitante com TBP.

Apêndice 4. Grupo de pacientes com outros diagnósticos clínicos

Paciente	Baciloscopia direta	colorimétrico ANP	Baciloscopia sedimento	colorimétrico do sedimento	Cultura	Dx.TBP	TBPHIV+/-	Dx.clínico	Tratamento prévio
1	1		1	1	1	1	1	DPOC	1
2	1		1	1	1	1	1	Insuficiência renal aguda	1
3	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
5	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
6	1	1	1	0	1	1	1	Insuficiência renal crônica	1
7	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
9	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/pneumonia	1
10	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia pulmonar	1
13	1	1	1	1	1	1	1	Linfoma não-Hodgkin	1
14	1	1	1	1	1	1	1	Aneurisma Aorta Abdominal	1
16	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
17	1	1	1	1	1	1	1	Insuficiência Cardíaca	1
18	1	1	1	1	1	1	1	Espondilite aquilosa	1
19	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
21	1	1	1	1	1	1	1	Cisto intracerebelear	1
22	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
23	1	1	1	1	1	1	1	Linfoma de Hodgkin	1
24	1	1	1	1	0	1	1	Tumor de laringe	1
25	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia de próstata	1
26	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
27	1	1	1	1	0	1	1	SIDA/TBganglionar	1
29	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
31	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/PNF	1

Paciente	Baciloscopia direta	colorimétrico ANP	Baciloscopia sedimento	colorimétrico do sedimento	Cultura	Dx.TBP	TBPHIV+/-	Dx.clínico	Tratamento prévio
32	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia de próstata.	1
34	1	1	1	1	1	1	1	Bronquiolite	1
36	1	1	1	1	1	1	1	Tb gantiglionar	1
37	1	1	1	1	1	1	1	TB urogenital	1
38	1	1	1	1	1	1	1	Insuficiência cardíaca	1
39	1	1	1	1	1	1	1	Bronquiectasia	1
41	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia de bexiga	1
42	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/pneumocistose	1
43	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/Pneumocistose	1
44	1	1	1	1	1	1	1	Sepsis	1
45	1	1	1	0	1	1	1	DPOC	1
46	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
47	1	1	1	1	1	1	1	Broncoespasmos	1
48	1	0	1	1	1	1	1	Insuficiência renal crônica/pneumonia	1
50	1	1	1	1	1	1	1	Porfíria	1
51	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/Sepse	1
52	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
53	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
54	1	1	1	1	1	1	1	Sepse	1
55	1	1	1	1	1	1	1	Lúpus/pneumonia	1
56		1	1	1	1	1	1	Insuficiência cardíaca	1
57	1	1	1	1	1	1	1	TBUrogenital/ sepsis	1
58	1	1	1	1	1	1	1	Bronquite	1
59	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
61	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia de pulmão	1
62	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
63		1	1	1	1	1	1	Lúpus	1

Paciente	Baciloscopia direta	colorimétrico ANP	Baciloscopia sedimento	colorimétrico do sedimento	Cultura	Dx.TBP	TBPHIV+/-	Dx.clínico	Tratamento prévio
67	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
70		1	1	1		1	1	Hemorragia digestiva alta	1
72	1	1	1	1	1	1	1	SIDA	1
73	1	1	1	1	1	1	1	SIDA	1
74	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/Asma	1
75	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia de ovário	1
76	1	1	1	1	1	1	1	TB pleural	1
77	1	1	1	1	1	1	1	Laringotraqueo bronquite	1
78	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/Pneumocistose	1
79		1	1	1	1	1	1	Asma	1
81	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia de pulmão	1
82	1	1	1	1	1	1	1	Asma	1
83	1	1	1	1	1	1	1	Linfoma de Hodgkin	1
85	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/Pneumonia	1
86	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia de pulmão	1
87	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
88	1	0	1	1	1	1	1	Neoplasia de laringe	1
89	1	1	1	1	1	1	1	Pneumectomia	1
90	1	1	1	1	1	1	1	Bronquiectasia	1
91		1	1	1	1	1	1	Neoplasia de pulmão	1
92	1	1	1	1	1	1	1	SIDA+TB gálgionar(M.avium)	1
93	1	1	1	1	1	1	1	Diabetes	1
95	1	1	1	1	1	1	1	Insuficiência renal crônica	1
96	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
97	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/pneumonia	1
98		1	1	1	1	1	1	sepse	1

Paciente	Baciloscopia direta	colorimétrico ANP	Baciloscopia sedimento	colorimétrico do sedimento	Cultura	Dx.TBP	TBPHIV+/-	Dx.clínico	Tratamento prévio
99	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia hepática	1
100	1	1	1	1	1	1	1	Insuficiência cardíaca	1
103	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
105		1	1	1	1	1	1	Insuficiência cardíaca	1
106	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
107	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/TB gnagionar	1
108	1	1	1	1	1	1	1	Insuficiência renal crônica	1
110		1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
112	1	1	1	1	1	1	1	Ppneumectomia	1
113	1	1	1	1	1	1	1	DPOC	1
114	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
115	1	1	1	1	1	1	1	SIDA// Choque séptico	1
116	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
117	1	1	1	1	1	1	1	Linfoma de Hodgkin	1
118	1	1	1	1	1	1	1	Lobectomia pulmonar	1
119	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia de pulmão	1
120	1	1	1	1	1	1	1	HIV/ Pneumocistose	1
122	1	1	1	1	1	1	1	Bronquiectasia	1
125	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/Pneumocistose	1
129	1	1	1	1	1	1	1	Hepatite auto- imune/pneumonia	1
130	1	1	1	1	1	1	1	Lúpus	1
132	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/Neoplasia urogenital.	1
133	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
134	1	1	1	1	1	1	1	Insuficiência renal crônica	1
135	1	1	1	1		1	1	Leucemia mielóide aguda/ sepse	1

Paciente	Baciloscopia direta	colorimétrico ANP	Baciloscopia sedimento	colorimétrico do sedimento	Cultura	Dx.TBP	TBPHIV+/-	Dx.clínico	Tratamento prévio
137	1	1	1	1	1	1	1	Pneumonia	1
140	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/pneumocistoseT	1
141	1	1	1	1	1	1	1	SIDA/Abcesso hepático	1
142	1	1	1	1	1	1	1	Embolia pulmonar	1
144	1	1	1	1	1	1	1	Neoplasia de pulmão	1
145	1	1	1	1	1	1	1	estenose de traquéia/sepse	1
146	1	1	1	1	1	1	1	SIDA	1
148	1	1	1	0	1	1	1	DPOC	1
149	1	1	1	1	1	1	1	Lúpus/sepse	1
150		1	1	1	1	1	1	Pneumonia/ sepse	1

0: resultado positivo; 1: resultado negativo; 1: diagnóstico clínico não TBP

- paciente de nº 6 gênero masculino, 56 anos, tabagista internado por apresentar tosse, expectoração, dispnéia e febre. Foi solicitado baciloscopia que resultou negativa e Rx com de discreto infiltrado na base pulmonar Esquerda. Odiagnostico final foi de sepse, com foco pulmonar, e Insuficiência Respiratória;
- paciente nº 24, gênero masculino, de 61 anos com diagnóstico de tumor na corda vocal esquerda;
- paciente nº 27, gênero feminino, de 26 anos, portadora do HIV, internada por apresentar febre, adenomegalia e emagrecimento. A baciloscopia resultou negativa e o Rx de tórax revelou presença de infiltrado intersticial bilateral e velamento da base pulmonar esquerda, sendo o diagnóstico final de Tuberculose Ganglionar (TBG+SIDA);
- paciente nº 45 gênero feminino de 80 anos, foi internada por apresentar tosse, dispnéia, edema de membro inferiores. Solicitou-se baciloscopia que resultou negativa. Este resultado complementado com outros exames específicos levou ao

diagnóstico final de Pneumonia, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), Diabetes Mellitus e Insuficiência Renal Crônica;

- o paciente nº 48, gênero masculino, 34 anos, etilista, tabagista e usuário de drogas foi internado por apresentar tosse, dispnéia e febre. Foi solicitado, além da baciloscopia, o exame de sorologia para HIV que resultou negativo, Rx de tórax evidenciando cardiomegalia e Tomografia Computadorizada de Tórax com laudo de infiltrado peribrônquico-vascular. O diagnóstico conclusivo foi de Pneumonia com Insuficiência Respiratória;
- o paciente nº 88, gênero masculino, 46 anos, etilista, tabagista foi internado por apresentar abscesso cervical, tosse, expectoração, emagrecimento, febre, cefaléia, adenomegalia. Com antecedente de laringectomia total foi solicitada baciloscopia de escarro que resultou negativa. O diagnóstico clínico foi de Câncer de laringe;
- paciente nº 148, gênero masculino, 64 anos, tabagista em uso de corticosteróides no momento da internação apresentou tosse e febre sendo diagnosticado Enfisema pulmonar. Solicitou-se baciloscopia que resultou negativa e o diagnóstico final foi de úlcera duodenal, broncopneumonia e DPOC.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)