

COMPARAÇÃO DA PCR, BACILOSCOPIA E CULTURA NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE HUMANA

Ana Cristina Barbosa de Assis¹
Aristeu Vieira da Silva²
Rodrigo Costa da Silva³
Helio Langoni^{3*}

RESUMO

Duzentas amostras de pacientes, 195 de escarro e cinco de urina, enviadas ao Instituto Adolfo Lutz, Regional Bauru foram analisadas pela baciloscopia, cultura e reação em cadeia pela polimerase (PCR), com o objetivo de estudar as técnicas comparativamente e avaliar a implantação da PCR em um Centro de Diagnóstico de Zoonoses, considerando a importância do diagnóstico da tuberculose, o mais precoce possível para a instituição da terapêutica, visando o tratamento do paciente e diminuindo a transmissão para outras pessoas ou animais. Após baciloscopia concentrada, as amostras foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen. As amostras descontaminadas com a técnica N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio a 2% foram cultivadas nos meios de Löwenstein-Jensen, Löwenstein-Jensen com ácido par-nitrobenzóico e de Stonebrink. A PCR foi realizada utilizando-se os primers para Complexo *Mycobacterium* spp., *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Dezesesseis amostras foram positivas para o isolamento de *M. tuberculosis* e uma para *M. flavescens*. Dezesete amostras foram positivas à baciloscopia. O resultado da PCR permitiu a identificação de 25 amostras de *M. tuberculosis* pelo primer IS6110 e uma amostra identificada bioquimicamente e pelo primer Complexo *Mycobacterium* spp. A sensibilidade e especificidade da PCR em relação à cultura, considerada o padrão-ouro, foram de 94,74% e 96,67%, respectivamente. A PCR apresentou maior sensibilidade que a baciloscopia e a cultura, e essas não diferiram entre si. A PCR mostrou-se reprodutível na identificação de *M. tuberculosis* e *Mycobacterium* spp., sendo capaz de realizar um importante diagnóstico diferencial com *M. bovis*, podendo ser aplicada na rotina de diagnóstico da tuberculose como um método confiável em termos de sensibilidade e de especificidade.

Palavras-chave: *Mycobacterium* spp., *M. bovis*, tuberculose pulmonar, diagnóstico, PCR.

COMPARISON AMONG PCR, BACILOSCOPY AND CULTURE IN HUMAN TUBERCULOSIS DIAGNOSIS

ABSTRACT

Two hundred samples, 195 of sputum and five of urine, sent to Adolfo Lutz Institute, Bauru Regional, were analyzed for baciloscopia, culture and polymerase chain reaction (PCR) aiming to study comparatively these tests and to evaluate the implantation of PCR in a Zoonosis Diagnosis Center, considering the importance of previous tuberculosis diagnosis to the institution of the therapy, aiming the treatment of the patient and decreasing the

¹ Departamento de Medicina Tropical e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brasil.

³ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

* Autor correspondente: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Distrito de Rubião Júnior, s/n. 18618-000. Botucatu, SP, Brasil. Email: hlangoni@fmvz.unesp.br (H. Langoni)

transmission to other persons and animals. After de concentrated baciloscopia, the samples were stained by Ziehl-Neelsen dye. The decontaminated samples, by N-actetil-L-cisteine and 2% sodium hydroxide methods were cultured in Löwenstein-Jensen, Löwenstein-Jensen with para-nitrobenzoic and Stonebrink medias. PCR was performed using primers to Complex *Mycobacterium* spp., *M. tuberculosis* and *M. bovis*. Sixtieth samples were positive to the isolation of *M. tuberculosis* and only one to *M. flavescens*. Seventieth samples were positive to the baciloscopia. The PCR result allowed the identification of 25 *M. tuberculosis* samples for IS6110 primer and only one sample biochemically identified and by Complex *Mycobacterium* spp. primer. The PCR sensitivity and specificity compared to the culture, golden-standard, were 94.74% and 96.67%. PCR presented higher sensitivity than baciloscopia and the culture, and these didn't differ from each other. PCR showed itself to be reproducible on the identification of *M. tuberculosis* and *Mycobacterium* spp., being capable to perform an important differential diagnosis with *M. bovis*, being capable to be applied at the tuberculosis diagnosis routine as a confident method based in sensitivity and specificity.

Keywords: *Mycobacterium* spp., *M. bovis*, pulmonary tuberculosis, diagnosis, PCR.

COMPARACIÓN DE LA PCR, BACILOSCOPIA Y CULTURA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS

RESÚMEN

Doscientas muestras de pacientes, 195 de esputo e cinco de orina, enviadas al Instituto Adolfo Lutz, Regional Bauru fueron analizadas por la baciloscopia, cultura y reacción en cadena por la polimerase (PCR), con el objetivo de estudiar las técnicas comparativamente y evaluar la implantación de la PCR en un Centro de Diagnóstico de Zoonosis, considerando la importancia del diagnóstico de la tuberculosis, lo más prematuro posible para la institución de la terapéutica, mirando el tratamiento del paciente y reduciendo la transmisión para otras personas o animales. Después de la baciloscopia concentrada, las muestras fueron coradas por la técnica de Ziehl-Neelsen. Las muestras descontaminadas con la técnica de N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio 2% fueron cultivadas en los medios de Löwenstein-Jensen, Löwenstein-Jensen con ácido para-nitrobenzóico y de Stonebrink. La PCR fue realizada utilizándose los primers para Complejo *Mycobacterium* spp., *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Dieciséis muestras fueron positivas para el aislamiento de *M. tuberculosis* y una para *M. flavescens*. Diecisiete muestras fueron positivas para la baciloscopia. El resultado de la PCR permitió la identificación de 25 muestras de *M. tuberculosis* con el primer IS6110 y una muestra identificada bioquímicamente y por el primer Complejo *Mycobacterium* spp. La sensibilidad y especificidad de la PCR con relación a la cultura, padrón-oro, fueron de 94,74% y 96,67%, respectivamente. La PCR presentó mayor sensibilidad que la baciloscopia y la cultura, y esas no se diferenciaron. La PCR se mostró reproductible en la identificación de *M. tuberculosis* y *Mycobacterium* spp., pudiendo realizar un importante diagnóstico diferencial con *M. bovis*, para ser aplicada en la rutina diagnóstica de la tuberculosis como un método confiable en relación a la sensibilidad y especificidad.

Palabras-clave: *Mycobacterium* spp., *M. bovis*, tuberculosis pulmonar, diagnóstico, PCR.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa cujo agente etiológico foi identificado por Robert Koch em 1882, e denominado *Mycobacterium tuberculosis*. Até a

década 90, a excessiva confiança na efetividade do controle da tuberculose, por meio do uso do esquema terapêutico curto, gerou expectativas quanto a sua possível erradicação (1,2). Isso determinou gradual desinteresse pela pesquisa em tuberculose, seja para obtenção de novos fármacos seja na avaliação de novos métodos diagnósticos (3,4).

O aumento da taxa de abandono do tratamento antituberculose agravada tanto pelo aumento da incidência da tuberculose associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) quanto pelo aparecimento da mutirresistência, levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a considerar a tuberculose uma emergência mundial, passando seu controle novamente a constituir um problema de saúde pública (5). Dos 9,27 milhões de casos incidentes, 1,37 milhões (15%) foram em pacientes positivos para o vírus da imunodeficiência adquirida (6), aumentando a importância de doenças concorrentes e suscetibilidade à infecção (2).

O Brasil está entre os 22 países onde se concentram 80% dos casos de tuberculose do mundo. Dos 85 mil casos de tuberculose notificados anualmente no Brasil, cerca de 8% estão infectados pelo HIV (7). Por outro lado, estima-se em 600 mil as pessoas vivendo com HIV em nosso país, sendo a tuberculose uma das principais causas de morte nesses pacientes (8). Um dos principais problemas a serem enfrentados é a falta de informação da população, considerada o grande motivo dos altos índices de tuberculose no Brasil. O adensamento populacional nas periferias das grandes cidades sem adequadas condições sanitárias contribui para o aumento do número de casos no país. Outro ponto que agrava essa situação em todo o mundo é a associação tuberculose com a Aids.

Considerando a importância do *M. bovis* como agente da tuberculose humana (2,9-11) a Organização Mundial da Saúde (OMS) convocou uma reunião sobre Tuberculose Zoonótica em Genebra em 1993, com o objetivo de atualizar a situação da enfermidade humana e animal no mundo inteiro (12). Os isolamentos detectados no Brasil apresentam padrões únicos (9).

As técnicas bacteriológicas tradicionais, empregando baciloscopia e cultura, permanecem como as únicas formas seguras de diagnosticar tuberculose, pois demonstram a presença do bacilo causador da doença (3,13).

Levando-se em consideração a importância do diagnóstico da tuberculose o mais precoce possível para a instituição de terapêutica no sentido de diminuir sua transmissão para outras pessoas ou animais, na dependência do agente envolvido, o objetivo do presente trabalho foi comparar as técnicas de baciloscopia e cultura com a PCR, e avaliar a implantação da PCR em um Centro de Diagnóstico de Zoonoses, considerando a importância do diagnóstico da tuberculose.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Amostras dos pacientes, sendo 195 de escarro e cinco de urina, provenientes de diferentes centros de saúde da cidade e microrregião de Bauru foram enviadas ao laboratório do Instituto Adolfo Lutz entre junho de 2002 a março de 2003.

Baciloscopia e Cultura

As amostras foram descontaminadas e analisadas pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen em busca de BAAR. Utilizaram-se as técnicas de descontaminação de N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio a 2% (NALC-NaOH) (14). As amostras foram semeadas em três meios de cultura: Löwenstein-Jensen, Löwenstein-Jensen com ácido para-nitrobenzóico (PNB) e meio de Stonebrink, específico para o isolamento primário do *M. bovis*. Uma

alíquota da amostra (500µL) foi separada para análise pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), mantida sob refrigeração a -20°C (15). As culturas foram observadas quanto ao desenvolvimento micobacteriano, semanalmente, durante nove semanas, com incubação a 37°C (16).

Extração de DNA

Tanto para as amostras de escarro como de urina, independente do resultado da baciloscopia, o DNA foi extraído pelo método da fervura (17). A técnica foi adaptada incluindo-se uma fase a mais com a utilização do tratamento com pó de vidro para purificação do DNA. Para tanto foi utilizada a resina de purificação Glasmax[®] (Life Technologies, EUA), que remove possíveis inibidores da *Taq* DNA polimerase (18).

Após a descontaminação com N-acetil-L-cisteína e NaOH a 2%, as amostras foram centrifugadas três vezes a 1600 x g por 10 minutos, com lavagens repetidas do sedimento com Tris-HCl EDTA (TE), 10mM Tris pH 8,0 e 1mM EDTA. Após cada centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em 100µL de TE e agitado vigorosamente por 30 segundos (16). Finalmente, o sedimento foi ressuspensionado em 50µL de TE, fervido por 10 minutos e centrifugado por 1600 x g por 5 minutos. Ao sobrenadante acrescentou-se 5µL da resina. As amostras foram centrifugadas a 1600 x g e ao sedimento acrescentou-se 200µL de etanol, deixando-se evaporar por 60 minutos, ressuspensionando-se em 30µL de TE. Os microtubos foram submetidos ao aquecimento a 50°C por 10 minutos, em banho-maria, e centrifugados por 1 minuto a 1600 x g. O sobrenadante foi congelado em microtubos devidamente identificados a -20°C até o momento da realização da PCR.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Ao DNA extraído (5µL) foram acrescentados 45µL da mistura de reagentes da PCR contendo 1,25U *Taq* DNA polimerase, 200µM dNTP, tampão da *Taq* DNA polimerase (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM KCl; 0,15mM MgCl₂), 20 µmol de cada primer. A amplificação consistiu de uma fase inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos com 1 minuto a 94°C para desnaturação, 2 minutos a 65°C para ligação dos primers e 1 minuto a 72°C na extensão do amplificado em cada ciclo. Ao final manteve-se a temperatura em 72°C por 10 minutos para a polimerização dos fragmentos incompletos (19).

Para os oligonucleotídeos específicos para *M. bovis* (19) e para os oligonucleotídeos específicos para *Mycobacterium* spp. (20) foram realizados 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 58°C por 60 segundos e 72°C por 10 minutos. Após as amostras foram refrigeradas a -20°C até o momento da análise do produto amplificado. Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5µL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2,5%. A corrida foi realizada a 100V por 90 minutos. A seguir, o gel foi corado com brometo de etídio por uma hora, e a visualização das bandas realizada em transluminador ultravioleta. O gel foi fotografado pelo sistema tipo Polaroid.

Para o primer de *M. bovis*, as condições da reação foram às mesmas, com exceção da temperatura de anelamento, que foi de 68°C, com 30 ciclos. Foram utilizados os primers de *Mycobacterium* spp. (20), TB-1 (5'-GAGATCGAGCTGGATCC-3') e TB-2 (5'-AGCTGCAGCCCAAAGGTGTT-3'), que delimitam um segmento de 383 pares de base (pb), que codifica o antígeno de 65 KDa -HSP 65-, presente em todas as micobactérias (19).

Utilizou-se ainda primers específicos para o Complexo *M. tuberculosis*, IS1 (5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3') e IS2 (5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'), que delimita um fragmento de 123pb, e primers específicos para *M. bovis*, JB-21 (5'-

TCGTCCGCTGATGCAAGTGC-3') e JB-22 (5'-CGTCCGCTGACCTCAAGAAG-3'), que delimita um fragmento de 500pb (15,19).

A cada amplificação das amostras clínicas, foram utilizados controles positivos com o DNA extraído da cepa de referência e os controles negativos com todos os reagentes da PCR, acrescidos de 5µL de TE. Como cepas padrão foram utilizadas: *M. tuberculosis* - H37RV (Instituto Adolfo Lutz, SP), *M. bovis* - AN5 (Instituto Biológico, SP), *M. avium* - D₄ (Instituto Biológico, SP).

Análise estatística

Os resultados dos diferentes métodos utilizados foram considerados, para efeitos de análise, apenas como positivos ou negativos independente do grau de crescimento microbiano, do tempo de cultura para positividade da amostra, quantidade de micobactérias nas lâminas e intensidade das bandas dos *amplicons*. Como padrão-ouro foram considerados os resultados da cultura para *Mycobacterium* spp., utilizando-se a combinação dos resultados obtidos pela cultura nos meios de Löwestein-Jensen, Stonebrink e Löwestein-Jensen com PNB. Amostras positivas em qualquer um destes meios foram consideradas como verdadeiro-positivas. Os resultados da baciloscopia, da cultura em meio Petroff e da PCR, tendo como base o resultado do padrão-ouro, foram comparados entre si pela determinação das áreas das curvas ROC. Calculou-se também os índices de performance dos métodos segundo o proposto por Mackinnon (21) frente ao resultado do padrão-ouro. Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (22).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 200 pacientes estudados, 144 (72%) eram do sexo masculino e 56 (28%) feminino. A idade média no grupo masculino foi de 48,8 anos e no grupo de mulheres de 44,8 anos, sem diferença significativa de positividade entre os sexos.

A Tabela 1 sumariza as estimativas de desempenho para a baciloscopia, cultura Petroff e PCR frente ao resultado do padrão-ouro. A sensibilidade e especificidade da PCR em relação à cultura, considerada o padrão-ouro, foram de 94,74% e 96,67%, respectivamente. A PCR apresentou maior sensibilidade que a baciloscopia e a cultura, e essas não diferiram entre si. O estudo comparativo entre as curvas ROC (Figura 1) da baciloscopia, cultura Petroff e PCR, mostrou que a PCR foi o método mais eficiente, diferindo significativamente da baciloscopia (*P* = 0,007) e da cultura Petroff (*P* = 0,001), não havendo diferença no resultado destas duas últimas (*P* = 0,873).

O resultado da PCR permitiu a identificação de 24 (12,1%) amostras de *M. tuberculosis* pelo primer IS6110 enquanto a amostra de *M. flavescens* foi identificada bioquimicamente e pelo primer *Mycobacterium* spp. (14,19). Não houve diferença entre os resultados da PCR e da cultura NALC (*P* = 0,13), com discordância entre os resultados em sete amostras (3,5%), considerada excelente (κ = 0,82).

A baciloscopia foi positiva em 18 (9,0%) amostras. A cultura descontaminada com a técnica NALC foi positiva em 19 (9,5%). Existe concordância significativa entre eles, embora não seja excelente (k = 0,55). A despeito das proporções de positividade na baciloscopia e na cultura NALC não diferirem significativamente (*P* = 1,00), houve discordância de resultados em 15 (7,5%) amostras. Uma amostra apresentou baciloscopia e cultivo Petroff negativo. Cresceu nos meios Löwensten-Jensen e Löwensten-Jensen com PNB e foi negativa ao teste da fita de niacina. Essa amostra foi encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para a realização das demais provas bioquímicas, que revelou tratar-se de *M. flavescens*. O rastreamento permitiu detectar que se tratava de material proveniente de paciente com Aids.

Tabela 1. Parâmetros de desempenho \pm erro-padrão do parâmetro da baciloscopia, cultivo Petroff e da reação em cadeia pela polimerase (PCR) no diagnóstico da tuberculose humana frente ao resultado do padrão-ouro (cultura descontaminada com NALC).

Parâmetro	Baciloscopia	Petroff	PCR
Sensibilidade	0,5789 \pm 0,1133	0,5263 \pm 0,1145	0,9474 \pm 0,0512
Especificidade	0,9613 \pm 0,0143	0,9945 \pm 0,0055	0,9667 \pm 0,0134
Eficiência*	0,9250 \pm 0,0186	0,9500 \pm 0,0154	0,9648 \pm 0,0131
Valor preditivo positivo	0,6111 \pm 0,1149	0,9091 \pm 0,0867	0,7500 \pm 0,0884
Valor preditivo negativo	0,9560 \pm 0,0152	0,9524 \pm 0,0155	0,9943 \pm 0,0057
Taxa de falso-positivo	0,0387 \pm 0,0143	0,0055 \pm 0,0055	0,0333 \pm 0,0134
Taxa de falso negativo	0,4211 \pm 0,1133	0,4737 \pm 0,1145	0,0526 \pm 0,0512
Kappa	0,5533 \pm 0,1027	0,6417 \pm 0,1038	0,8178 \pm 0,0667
Concordância de positivos	0,5946 \pm 0,0957	0,6667 \pm 0,0994	0,8372 \pm 0,0607
Concordância de negativos	0,9587 \pm 0,0107	0,9730 \pm 0,0085	0,9803 \pm 0,0075

* taxa de classificação correta

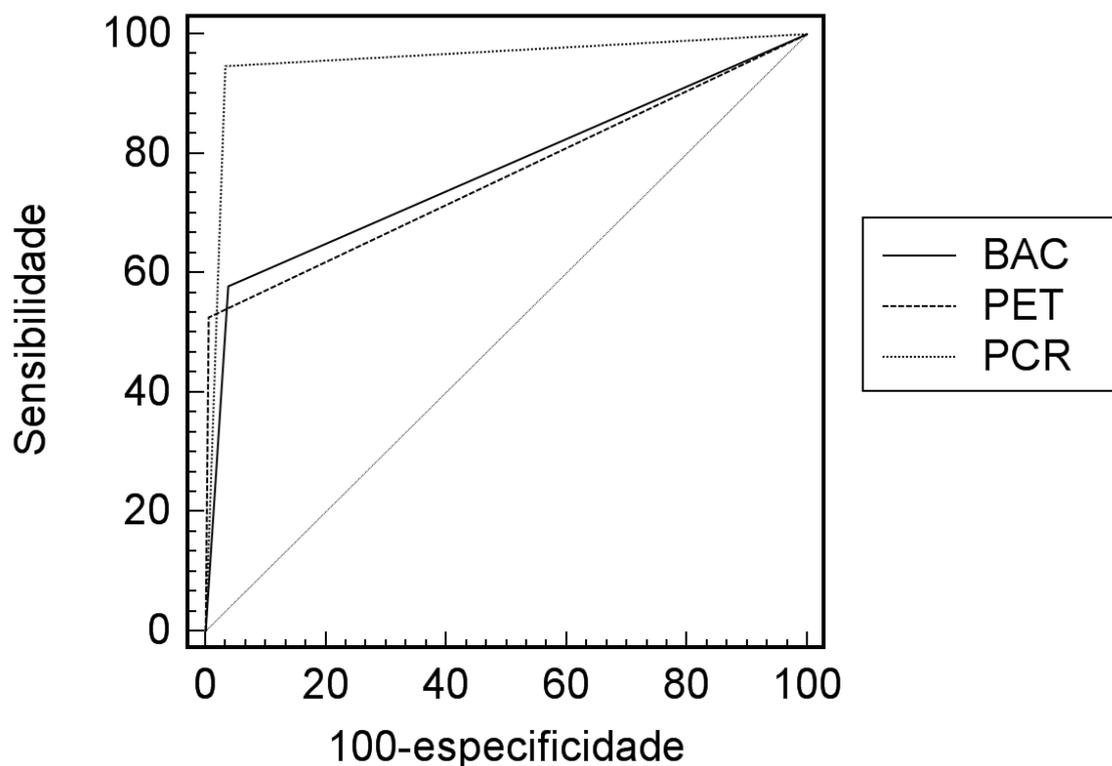


Figura 1. Curvas ROC para os resultados da baciloscopia (BAC), cultivo Petroff (PET) e da reação em cadeia pela polimerase (PCR) no diagnóstico da tuberculose humana, frente ao resultado do padrão-ouro (cultura descontaminada com NALC).

A proporção de positivos na cultura Petroff foi de 5,5% e na cultura NALC, de 9,5%, com diferença estatística entre os dois métodos de descontaminação ($P= 0,0269$). O isolamento de uma micobactéria atípica, *M. flavescens*, só foi possível com o método de descontaminação menos drástico, como NALC-NaOH 2%.

A reemergência da tuberculose nos países desenvolvidos e o aumento da sua incidência em países em desenvolvimento, em função do *M. tuberculosis*, tem tornado a identificação rápida do bacilo cada vez mais importante, tanto para o diagnóstico como para o tratamento. O diagnóstico baseado na baciloscopia é eficiente, porém pouco sensível e a realização da cultura bastante demorada (18).

Um diagnóstico laboratorial para tuberculose sensível e rápido é importante em todos os estágios da doença. A sua detecção precoce permite o tratamento adequado. Desta forma, métodos biomoleculares vem sendo aperfeiçoados cada vez mais para identificação rápida e precisa dos agentes infecciosos, assim como de *M. tuberculosis*. A PCR permite a detecção do DNA do agente em amostras clínicas, em casos de carga bacteriana baixa (2,10,23).

A baciloscopia positiva norteia o tratamento, a avaliação epidemiológica correta e a abordagem precisa dos comunicantes (1). Entretanto, se observarmos a média histórica dos casos de tuberculose diagnosticados no Brasil, apenas com dados epidemiológicos, clínicos e radiológicos, apresentando baciloscopia negativa, a taxa alcança 30%. Assim, um diagnóstico mais precoce e preciso é fundamental para permitir o início seguro do tratamento diante da baciloscopia de escarro negativo, particularmente, no diagnóstico de formas paucibacilares da doença, como a tuberculose na infância, a tuberculose extrapulmonar e, sem dúvida, as formas precoces da tuberculose pulmonar (24).

O presente trabalho mostrou que a técnica de amplificação do DNA, como recurso no laboratório de diagnóstico da tuberculose, é mais sensível que os métodos bacteriológicos. Quando se analisa um método novo, o desempenho do teste-padrão é um parâmetro crítico. Neste trabalho, o padrão ouro adotado foi a cultura descontaminada com o método menos drástico NALC-NaOH 2%, ainda que o resultado da cultura não tenha sido o esperado, em função das contaminações com bactérias de crescimento rápido que aconteceram. Nesse sentido, além da sensibilidade, a PCR mostrou maior especificidade por não sofrer influência de outros agentes. Contudo, a padronização da técnica, principalmente na extração do DNA e escolha correta dos primers, é fundamental para o sucesso do teste. Em espécimes clínicos como o escarro, são essenciais lavagens sucessivas, pois substâncias inibidoras da *Taq* DNA polimerase podem gerar resultados falso negativos.

A tuberculose, enquanto zoonose, sempre existiu em países onde não há um programa efetivo de controle da tuberculose animal. Ainda que a pasteurização do leite tenha reduzido drasticamente a tuberculose humana de origem bovina, ainda hoje no Brasil há regiões onde ele é consumido *in natura*, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. Também na Região Sudeste, por uma questão cultural, o leite comercializado informalmente encontra mercado consumidor (25). As pessoas que trabalham diretamente com os bovinos tem maior risco de contrair a doença em virtude da exposição ocupacional.

Não se isolou *M. bovis*, o que pode ser explicado pelo fato da população estudada ser na sua maioria proveniente da região urbana, o que está de acordo com o relatado por Grange (14), pois as chances de infecção por este agente são maiores naquelas pessoas que desenvolvem atividades com os animais, principalmente com os bovinos.

Considerando-se os resultados encontrados nos estudos da PCR, conclui-se que esta técnica pode ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico diferencial de *M. bovis* e *Mycobacterium* spp., podendo ser aplicada na rotina diagnóstica da tuberculose

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado, FAPESP 2000/04332-8, ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e aos profissionais envolvidos do Instituto Adolfo Lutz pelo encaminhamento das amostras dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Afiune JB, Ide NJ. Diagnóstico da tuberculose pulmonar escarro negativo. *J Pneumol.* 1993;19:37-41.
2. Milián-Suazo F, Pérez-Guerrero L, Arriaga-Díaz C, Escartín-Chávez M. Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Prev Vet Med.* 2010;97:37-44.
3. Ministério da Saúde. Governo investe no tratamento da tuberculose. Brasília; 2004 [cited 2004 Abr 09]. Available from: <<http://portalweb02.saude.gov.br>>.
4. Brudney K, Dobkin J. Resurgent tuberculosis in New York city. HIV, homelessness and the decline of tuberculosis control program. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144:745-9.
5. Cormican MG, Glennon M, Riain UN, Smith T, Flynn J, Gannon F. Evaluation PCR assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994;22:357-60.
6. World Health Organization. WHO report 2009 – Global tuberculosis control. Geneva: WHO Press; 2009 [cited 2009 Fev 9]. Available from: <www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html>.
7. Eisenach DK, Cave DM, Bates HJ, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1989;161:977-81.
8. Saraceni V, King BS, Cavalcante SC, Golub JE, Lauria LM, Moulton LH, et al. Tuberculosis as primary cause of death among AIDS cases in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:769-72.
9. Fisanotti JC, Alito A, Bigi F, Latini O, Roxo E, Cicuta E, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from South America. *Vet Microbiol.* 1998;60:251-7.
10. Wei C-Y, Hsu Y-H, Chou W-J, Lee CP, Tsao W-L. Molecular and histopathologic evidence for systemic infection by *Mycobacterium bovis* in a patient with tuberculous enteritis, peritonitis, and meningitis: a case report. *Kaohsiung J Med Sci.* 2004;20:302-7.
11. Moonan PK, Chatterjee SG, Lobue PA. The molecular epidemiology of human and zoonotic *Mycobacterium bovis*: The intersection between veterinary medicine and public health. *Prev Vet Med.* 2009;88:226-7.

12. Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW, Fischl MA, Seprkowitz KA, Goldberger MJ, et al. Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. *J Infect Dis.* 1993;168:537-51.
13. Frieden RT, Sterling T, Pablos-Mendez A. The emergency of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med.* 1993;328:521-6.
14. Grange JM. Human and bovine tuberculosis: new threats from an old disease. *Br Vet J.* 1996;152:3-4.
15. Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol.* 1989;3:843-9.
16. Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias [Série A. Normas e Manuais Técnicos]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2008.
17. Kocagöz T, Yilmaz E, Ozkara S, Kocagöz S, Hayran M, Sachedeva M, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction a simplified procedure. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1435-8.
18. Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with n-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am J Epidemiol.* 1963;87:775-9.
19. Mackinnon A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput Biol Med.* 2000;30:127-34.
20. Olival AA, Spexoto AA, Campos DFS, Ferreira F, Fonseca LFL, Santos MV, et al. Hábitos de consumo do leite informal, associados ao risco de transmissão de doenças no município de Pirassununga, SP. *Hig Aliment.* 2002;16(102):35-40.
21. Railey WC. Diagnosis of tuberculosis. *Clin Chest Med.* 1980;1:209-17.
22. Triola MF. Introdução à estatística. 9ª ed. Rio de Janeiro: LTC; 2005.
23. Raviglione MC, Snider Jr DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *J Am Med Assoc.* 1995;273:220-6.
24. Rodríguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA, Del-Portillo P. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology.* 1995;141:2131-8.
25. Rossetti ML, Jardim SB, Rodrigues VF, Moura AR, Oliveira H, Zaha A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J Microbiol Methods.* 1997;28:139-46.

Recebido em: 13/08/10

Aceito em: 05/04/11