

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *M. tuberculosis*: UMA REVISÃO DE TÉCNICAS

Sara Macente

Mestranda no Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia na Universidade Estadual de Maringá - Uem. E-mail: sara_mascente@hotmail.com

Fernando Henrique das Mercês Ribeiro

Coordenador do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR. E-mail: fernandoribeiro@cesumar.br

RESUMO: A Tuberculose é a doença infecto-contagiosa mais grave em países em desenvolvimento, com cerca de três milhões de óbitos no mundo, infectando 8,8 milhões de pessoas anualmente. Esta doença acomete pessoas aparentemente saudáveis e é de extrema gravidade em pessoas imunossuprimidas. O diagnóstico definitivo da tuberculose é feito através da baciloscopia e cultura em meio Lowenstein-Jensen, seguido de uma bateria de provas bioquímicas para a identificação da espécie causadora da infecção. Porém, estas técnicas apresentam baixas sensibilidade e especificidade e um alto tempo para a liberação dos resultados. O desenvolvimento rápido e disponibilidade de uma variedade de novas tecnologias moleculares proporcionam uma série de opções para o diagnóstico preciso e rápido de doenças infecciosas. Este é particularmente o caso da tuberculose. Portanto, a aplicação clínica de detecção e amplificação de sequências nucleotídicas específicas do *Mycobacterium tuberculosis* para diagnóstico de rotina é importante e precisa ser discutida. Será focalizado o papel laboratorial de duas técnicas para o diagnóstico direto da tuberculose - PCR e LCR -, comparando-as para verificação de sua eficácia na rotina laboratorial.

PALAVRAS-CHAVE: *M. tuberculosis*; PCR; LCR; Diagnóstico Molecular.

M. tuberculosis MOLECULAR DIAGNOSIS: A REVIEW ON TECHNIQUES

ABSTRACT: Tuberculosis is the most serious contagious infectious disease in developing countries, with an average of three million obits in the world, infecting 8.8 million people annually. This disease attacks people who are apparently healthy and is extremely serious among immunosuppressed people. The definitive tuberculosis diagnosis is done through the microscopy for acid-fast bacilli and Lowenstein-Jensen culture, followed by a biochemical battery of tests to identify the species that caused the infection. However, these techniques present low sensibility and specificity and it takes a long time to get access to the results. The fast development and the variety of new molecular techniques available provide several options for an exact and fast infectious disease diagnosis. This is particularly the situation for tuberculosis. Therefore, the clinic application of detection and amplification of specific *Mycobacterium tuberculosis* nucleotide sequences for routine diagnosis is important and needs to be discussed. The role of two laboratory techniques for the direct diagnosis of tuberculosis will be focused - PCR and LCR -, comparing them to verify their efficacy on the laboratorial routine.

KEYWORDS: *M. tuberculosis*; PCR; LCR; Molecular Diagnosis.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é historicamente um importante problema de saúde pública no mundo (BIERRENBACH et al., 2007). Trata-se de uma doença infecto-contagiosa que assume evolução crônica. Essa enfermidade afeta a humanidade há

pelo menos 8.000 anos. Até a metade do século XIX, o caráter infecto-contagioso da tuberculose não era reconhecido. A doença era atribuída a diversas causas, entre elas, a hereditariedade (RODRIGUES et al., 2007; NASCIMENTO, 2005). Em geral, quando uma pessoa adoecia, vários membros da família também adoeciam, não se percebia naquela época que o confinamento familiar favorecia a propagação da doença na família (SOUZA; SILVA, 2007). Em 1882, Robert Koch identificou o *M. tuberculosis* ou Bacilo de Koch (RODRIGUES et al., 2007; YZQUIERDO et al., 2007), sendo um marco fundamental para o conhecimento da doença e significou, também, uma importante contribuição para o fortalecimento da teoria da transmissibilidade (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008). O espectro clínico é extremamente variado e vai desde formas assintomáticas até formas graves disseminadas, com significativa perda de peso e considerável evolução para o óbito (HOUWERT et al., 1998).

Apesar de ser uma doença potencialmente prevenível e curável, a tuberculose é ainda hoje um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, que correspondem a 90% dos casos da doença (SCHROEDER et al., 2002). No mundo, estima-se em dois bilhões o número de pessoas que apresentam infecção tuberculosa latente e que, anualmente, ocorram cerca de 8,8 milhões de novos casos (RODRIGUES et al., 2007; MONATGNE; SNIDER, 1994; FOUNTAIN, 2001; LEITE et al., 2006). Estima-se que mais de 50 milhões de brasileiros estejam infectados pelo bacilo da tuberculose (BRASIL, 2005). Segundo as estimativas atuais da OMS, ocorrem 110 mil novos casos anuais de tuberculose no Brasil, ou seja, uma taxa de incidência de 62 por 100 mil habitantes, situando o país na 15ª posição entre os 22 países responsáveis por 80% do total de tuberculose do mundo (BIERRENBACH et al., 2007; BRASIL, 2005). O número de óbitos por tuberculose no Brasil ultrapassa os 6.000 casos por ano (RODRIGUES et al., 2007; SOUZA; SILVA, 2007). Assim, ela é a 9ª causa de internações por doenças infecciosas, ocupando o 7º lugar em gastos com internações do Sistema Único de Saúde (SUS) e é a 4ª causa de mortalidade por doenças infecciosas no Brasil (BRASIL, 2005).

Como a infecção pelo HIV/SIDA tem efeito imunodepressor e predispõe o indivíduo infectado a desenvolver tuberculose, a epidemia de HIV/SIDA, entre outras consequências, levou ao crescimento dos casos da enfermidade em muitos países (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999; LEITE et al., 2006).

Embora a vacina BCG forneça proteção efetiva em crianças quando administrada no período neonatal, a proteção conferida contra formas da tuberculose em adultos, devido a razões ainda pouco esclarecidas, varia muito entre regiões do mundo. Na falta de uma vacina homoganeamente eficaz e tendo em vista que a maior fonte de infecção são os indivíduos doentes, o melhor recurso de prevenção disponível no sistema de saúde continua sendo a detecção precoce e tratamento dos casos (RODRIGUES et al., 2007). Mesmo que o diagnóstico presuntivo da doença possa ser feito através de dados da história clínica e achados radiológicos, o diagnóstico definitivo ainda depende da baciloscopia e cultura em meio Lowenstein-Jensen, seguido de uma bateria de provas bioquímicas para a identificação da

espécie causante da infecção. A microscopia direta após coloração pela Ziehl-Neelsen, em busca de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), é um método rápido e barato. No entanto, tem baixas sensibilidade e especificidade (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999). São necessários, no mínimo, 5.000 bacilos para que o teste seja positivo. Apesar de ser o padrão para a confirmação diagnóstica da tuberculose, a cultura requer mais de três semanas para um diagnóstico definitivo, pela própria característica de replicação do *M. tuberculosis*, podendo, ainda, não informar qual membro do complexo *M. tuberculosis* foi o causador da doença, o que pode confundir o diagnóstico e a epidemiologia (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999; YZQUIERDO et al., 2007; KONEMAN et al., 2000).

Avanços no campo da biologia molecular têm gerado novas técnicas para o diagnóstico de infecções por meio da detecção de sequências nucleotídicas específicas dos microorganismos (GARCÍA, 1990). Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos atraíram interesse considerável desde que ofereceram a oportunidade de encurtar o tempo requerido para detectar e identificar organismos do complexo *M. tuberculosis* em amostra respiratória e extrapulmonar (PIERSIMONI et al., 1998). Porém, a maioria dos laboratórios que usam estas tecnologias desenvolveu os próprios testes com uma grande variedade de *primers*, sondas, extração, amplificação e técnicas de detecção. Isto conduziu a uma inesperada variação de sensibilidade e especificidade. Para superar estas dificuldades, duas técnicas importantes têm sido introduzidas e testadas: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Reação em Cadeia da Ligase (LCR). A aplicação clínica de detecção e amplificação de sequências nucleotídicas específicas do *M. tuberculosis* para diagnóstico de rotina é importante e precisa ser discutida.

2 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

A PCR é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando à produção de milhões de cópias desta sequência para que possam ser facilmente detectáveis por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias. Essa técnica foi descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 e tem revolucionado a genética molecular, pois possibilita uma nova estratégia na análise dos genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de sequências, dispensando todas as trabalhosas etapas de clonagem gênica (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO). A amplificação dos trechos específicos do DNA se dá por ciclos com alterações de temperaturas. Existem variações de PCR a fim de melhorar a especificidade e a eficiência da reação.

Muitas micobactérias não-tuberculosas são de importância médica, pois ocorrem mais frequentemente em países desenvolvidos, onde a incidência de tuberculose é baixa. A detecção e diferenciação rápida de infecções causadas por micobactérias não-tuberculosas de micobactérias tuberculosas mostra-se uma estratégia precoce para o tratamento, haja vista que muitas micobactérias não-tuberculosas são resistentes aos antibióticos usados para tuberculose (MOKADDAS; AHMAD, 2007).

Pela sua alta sensibilidade e por utilizar *primers* que são

específicos para micobactérias do complexo *tuberculosis*, a PCR é capaz de, em poucas horas, determinar a presença do patógeno na amostra e ajudar na decisão da melhor terapêutica para o caso. Em condições extremas, esta técnica pode ser refinada para torná-la capaz de determinar não só a presença, mas também a sensibilidade de micobactérias aos tuberculostáticos disponíveis para o tratamento da tuberculose, além de estudos de epidemiologia molecular e tipagem de cepas em cultura (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999), e vem sendo utilizada como alternativa para os métodos tradicionais.

Pelo acima descrito, a escolha do DNA alvo e a definição dos *primers* dentro da sequência do DNA são fatores determinantes para sua acuidade (OGUSKU; SALEM, 2004). A escolha dos diversos *primers* utilizados na PCR para a identificação do *M. tuberculosis* tem apresentado resultados variáveis, principalmente em relação à sensibilidade do teste. Por esta razão, vários autores pesquisaram a utilização e avaliação de diferentes *primers* no teste. Os *primers* mais estudados são o IS6110, 65kDa (GroEL), 38 kDa (PhoS, CIE Ag78 ou Pab) e MPB64 (23 kDa) (OGUSKU; SALEM, 2004; ASSIS et al., 2007).

Entre os *primers* estudados, o IS6110 é o mais usado por ser uma sequência repetitiva no genoma do *M. tuberculosis* (de 1 a 20 cópias por célula), enquanto os outros estão sempre em um único local no material genético da micobactéria. Esta repetitiva sequência alvo no genoma prevê uma alta sensibilidade e especificidade na prova de PCR, pois quando múltiplas cópias de DNA alvo estão presentes, a sensibilidade de detecção de *M. tuberculosis* aumentará em proporção ao número de cópias, sem a necessidade de executar variações da PCR (OGUSKU et al., 2003). Isto é uma grande vantagem em espécies com pequeno número de micobactérias, como acontece em alguns casos de tuberculose. Apesar da sequência IS6110 estar presente em todas as *M. tuberculosis* isoladas até o momento no Brasil, estudos demonstraram que esta sequência foi relatada como ausente em cepas de *M. tuberculosis* isoladas na Índia (CHAUHAN et al., 2007), bem como foram detectadas sequências similares em cepas de micobactérias potencialmente patogênicas, tais como *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. chelonae* e *M. bovis* (PINTO et al., 2007). De acordo com dados da Organização Pan-Americana de Saúde e Organização Mundial de Saúde, muitos casos de tuberculose humana no mundo são causados pelo *M. bovis*. A diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* é particularmente importante, já que este último é resistente às drogas comumente usadas no tratamento da tuberculose (KATARIA, 1969).

O segundo *primer* de opção é o fragmento genômico MPB64, que foi demonstrado ser altamente específico para *M. tuberculosis*. Testado comparando-se com o IS6110, gerou menos resultados falso-positivos (MARTINS et al., 2000), porém com a necessidade de realizar variações da PCR. A qualidade da amostra pode influenciar diretamente na positividade da PCR. Quanto mais representativa for a amostra, melhor será o rendimento da detecção molecular (BAZZO et al., 2004).

Quando ocorre uma baixa sensibilidade da PCR, esta pode ser justificada pela introdução de substâncias inibidoras durante o procedimento de extração (ASSIS et al., 2007).

Para evitar esta inibição, alguns autores defendem a lavagem exaustiva do DNA obtido para eliminação de substâncias inibidoras da enzima Taq DNA polimerase (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999).

Há, também, muitos relatos de falso-positivo em testes de PCR quando comparados com os testes padrões para a detecção do *M. tuberculosis*. Este resultado é devido, provavelmente, à contaminação da reação de amplificação por DNA (*amplicons*), presença de organismos não-viáveis em pacientes tratados ou pacientes com recidiva de tuberculose (ASSIS et al., 2007), já que na PCR o alvo é o DNA da micobactéria, não um microorganismo vivo.

A ocorrência de resultados falso-positivos pode ser evitada quando é feita a otimização do laboratório de biologia molecular (BURKARD, 2000; KWOK; HIGUCHI, 1989).

Quando comparado o custo-benefício da PCR em relação às técnicas padrão utilizadas hoje no diagnóstico da tuberculose, observa-se que o tempo necessário para a realização da PCR é, em média, um dia, enquanto das técnicas hoje utilizadas varia entre 4 a 8 semanas, reduzindo, assim, o tempo para o diagnóstico final. Considerando apenas os reagentes usados em ambos os métodos de identificação, a PCR é 50% mais barata do que a identificação bioquímica. Além disso, uma única pessoa pode realizar a PCR. A identificação bioquímica usualmente envolve diferentes pessoas para esterilização, preparação dos meios e manejo das culturas. A manipulação de bactérias é mínima com PCR (SILVA et al., 2001), pois não há necessidade de cultivo e crescimento de microorganismos, proporcionando otimização da segurança no laboratório. Além disso, a PCR *in house* é factível considerando o custo de uma internação de um paciente com tuberculose, aguardando o diagnóstico definitivo, ou sua presença no ambiente familiar e social com alto risco de transmissão que essa doença possui (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999).

3 LIGASE CHAIN REACTION (LCR)

A LCR é uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos bastante pesquisada que utiliza quatro sondas de oligonucleotídeos, enzima DNA-ligase termoestável, enzima DNA-polimerase termoestável e nucleotídeos individuais. As sondas hibridizam duas a duas, uma após a outra, em uma sequência complementar específica dentro do DNA cromossômico a ser pesquisado, permanecendo um espaço de alguns nucleotídeos entre as sondas. A DNA-polimerase termoestável preenche esses espaços, utilizando os nucleotídeos individuais. Em seguida, a DNA-ligase termoestável atua unindo covalentemente as duas sondas, formando um produto complementar à sequência alvo (LJUNGQVIST et al., 1990).

Recentemente, a tecnologia da LCR se tornou comercialmente disponível para a detecção de espécies clínicas de *M. tuberculosis*. Porém, ainda há problemas, incluindo a presença de inibidores de reações de amplificação enzimáticas em espécies clínicas, que podem causar resultados falso-negativos, e contaminação com "*amplicons*", que geram resultados falso-positivos (BRISSENO-NOËL et al., 1989; CLARIDGE et al., 1993; LAFHER; CARRINO; MARSHALL, 1993; NOORD-

HOEK et al., 1994).

A LCx *M. tuberculosis* Assay (Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Chicago, III) é o terceiro teste de amplificação de ácidos nucleicos comercial para detecção de *M. tuberculosis* que foi desenvolvido e amplamente avaliado (MOORE; CURRY, 1998; AUSINA et al., 1997; TORTOLI; LAVINIA; SIMONETTI, 1997).

A LCx *M. tuberculosis* Assay usa a tecnologia de amplificação LCR para a direta detecção de espécies clínicas de *M. tuberculosis* (GAMBOA et al., 1998). Os métodos de amplificação LCR foram avaliados previamente para a detecção de outros agentes infecciosos. A sequência alvo da LCx *M. tuberculosis* Assay é criada dentro do gene cromossomal do *M. tuberculosis* que codifica proteínas do antígeno b. Esta sequência de gene parece ser específica para o complexo *M. tuberculosis* (MTBC) e foi detectado em todas as MTBC examinadas (ANDERSEN; HANSEN, 1989).

A LCx *M. tuberculosis* Assay é o primeiro teste comercial de amplificação de ácidos nucleicos semiautomáticos desenvolvidos para o uso com espécies respiratórias (GARRINO et al, 1999), e experiências limitadas foram relatadas para espécies não-respiratórias. Neste sistema, a preparação da amostra é executada manualmente, e a amplificação é feita pelo LCx Thermal Cycler. A detecção do produto amplificado é completamente automatizada pelo LCx Analyzer (GAMBOA et al., 1998).

A sensibilidade e especificidade dos resultados da LCx *M. tuberculosis* Assay foram relatadas sendo tão alta para as espécies respiratórias investigadas quanto os teste Gen-Probe *M. tuberculosis* Direct Test (Gen-Probe, San Diego, Calif.) quando comparado com a cultura. Porém, o LCx é automatizado, economizando tempo (MOORE; CURRY, 1998; GARRINO et al, 1999; JOUVESHOMME et al., 1998).

Uma desvantagem para usar sistemas de amplificação comerciais na rotina diária de laboratório é que os fabricantes não fazem recomendações quanto ao uso com espécies não-respiratórias (GAMBOA et al., 1998).

Os resultados falso-negativos poderiam ser explicados por um baixo número de microorganismos ou uma distribuição não uniforme dos microorganismos nas amostras clínicas (GARRINO et al, 1999). Este resultado falso-negativo também poderia ser explicado pela presença de possíveis inibidores de amplificação na amostra.

A utilidade de técnicas de amplificação de DNA é frequentemente limitada pela presença de inibidores de amplificação dentro das amostras clínicas. Em vários estudos, as maiores taxas de ocorrência de resultados falso-negativo que foram relatadas foram de 20% (CLARIDGE et al., 1993; NOORD-HOEK et al., 1994; KIRSCHNER et al., 1996; NOLTE et al., 1993; SOINI et al., 1992). Em um estudo prévio, foi observado que a preparação de ácidos nucleicos com Amplicor Sputum Preparation Kit® (Roche) frequentemente mostra a presença de inibidores de reação de amplificação. Depois dos procedimentos de preparo de ácidos nucleicos com Amplicor, foi sugerido o método Isotiocianato de Guanidina, os inibidores de amplificação foram eliminados em 96% das amostras. Em outro estudo, utilizando Gen Probe Amplified *M. tuberculosis* Direct Test, 7,5% das amostras de espécies não-respiratórias

demonstraram a presença de inibidores de reação da amplificação (GAMBOA et al., 1998). Embora, a LCx *M. tuberculosis* Assay incorpore dois passos de lavagem, inativação por calor, e lise mecânica na preparação da amostra, acredita-se que estes procedimentos não inativaram totalmente os inibidores presentes nestas amostras (LUMB et al., 1999; GAMBOA et al., 1998). Então, LCx *M. tuberculosis* Assay deveria incluir controles internos de amostras para avaliar a eficácia de cada reação de amplificação e assegurar que a amostra estaria livre de interferentes. O uso de controles internos identificará as amostras que são impróprias para amplificação ou aquelas que requeiram manipulação adicional para remover os inibidores, e o uso deles aumentará, a confiança nos resultados negativos (GAMBOA et al., 1998).

A LCx *M. tuberculosis* Assay mostrou uma sensibilidade e especificidade de 100% com esfregaço BAAR positivo (coloração de Ziehl Neelsen) para a amostra (IEVEN; GOOSENS, 1997; GAMBOA et al., 1998). Então, quando o resultado da LCx *M. tuberculosis* Assay for negativo para uma amostra com um esfregaço positivo, é altamente improvável que o paciente de quem a amostra é derivada tenha tuberculose. Um esfregaço positivo e LCx *M. tuberculosis* Assay de resultado negativo indicam uma micobactéria atípica, e precauções tomadas para uma diminuição do risco de transmissão, como o isolamento, por exemplo, seriam desnecessárias e iriam permitir a iniciação imediata do tratamento com uma combinação de drogas antituberculose, em vez das drogas normalmente usadas para o tratamento da tuberculose (GAMBOA et al., 1998). Esta é a real vantagem deste teste (GARRINO et al., 1999).

A LCx *M. tuberculosis* Assay não é útil para verificar a eficiência de terapia antituberculose, pois, ao contrário da cultura, este ensaio detecta microorganismos viáveis e não viáveis, por sua detecção ser através do DNA e não de seu crescimento. Isto pode acarretar em resultados falso-positivos também, pois pode haver cepas já mortas ou inativas, mas que ainda permanecem no organismo do paciente. Esta não diferenciação dos microorganismos viáveis dos não-viáveis restringe esta técnica.

O ensaio serve para uso dentro de um laboratório de microbiologia clínica experiente, pois a amplificação e passos da detecção são automatizados. Uma vez que a preparação da amostra é completada, o ensaio requer envolvimento mínimo de pessoal de laboratório, o procedimento inclui uma destruição automática dos produtos de amplificação depois da detecção, com o tempo para conclusão do teste que é aproximadamente 5 horas (LUMB et al., 1999; JOUVESHOMME et al., 1998; GAMBOA et al., 1998).

Com a disponibilidade comercial de um kit que pode confiavelmente detectar e identificar *M. tuberculosis* dentro de um dia útil, a metodologia de diagnóstico laboratorial de tuberculose mudará depressa. Embora seja teoricamente possível, não é praticável na maioria dos laboratórios devido ao custo. A execução diária deste teste só seria possível dentro de laboratórios centrais ou de referência (GARRINO et al., 1999).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O procedimento da amplificação de ácidos nucleicos teve considerável impacto na rápida detecção do *M. tuberculosis* diretamente de amostras respiratórias e não-respiratórias. Neste estudo foram analisados dois métodos moleculares muito estudados para a detecção de tal micobactéria: a PCR e a LCR.

Ambas as técnicas apresentam alta sensibilidade e especificidade na detecção do *M. tuberculosis*, proporcionando um rápido diagnóstico que se conclui em apenas um dia útil. A PCR oferece a possibilidade simultânea de pesquisar existência do agente e analisar a susceptibilidade às drogas, mesmo em amostras com pequeno número de micobactérias. Porém, tanto a PCR quanto a LCR apresentam várias desvantagens quando analisadas individualmente.

Nas duas técnicas foram constatados muitos resultados falso-positivos, que podem advir de contaminação por "amplicons" provenientes de outras amostras ou da presença de organismos não-viáveis em pacientes tratados, impossibilitando, assim, o uso destas técnicas para o monitoramento terapêutico. Em se tratando dos "amplicons", estes resultados podem ser evitados tomando-se algumas precauções dentro do laboratório para conter a disseminação destes fragmentos de DNA. Já no caso dos organismos não-viáveis, uma forma de eliminar esta desvantagem e fazer o monitoramento de tratamentos seria utilizar mRNA ao invés de DNA como sequência alvo, pois o mRNA só estará presente se a micobactéria estiver viável (HELLYER et al., 1999; STANLEY et al., 2007).

Pensando-se em sequências alvo, enquanto a IS6110 (a mais utilizada na PCR) pode ser encontrada em outras espécies de micobactérias que não pertencem ao complexo *M. tuberculosis*, o gene do antígeno b, utilizado como sequência alvo para a LCR pode ser perdido devido a mutações. Porém, relatos destas mutações não foram encontrados na literatura.

A PCR se mostrou mais eficiente em relação a amostras não-respiratórias do que a LCR, pois a segunda apresenta poucos estudos em relação a estas amostras. A LCR apresentou, também, resultados falso-negativos quando há baixo número de microorganismos na amostra ou uma má distribuição destes na amostra clínica.

Comparando-se os custos, a PCR mostra-se mais viável do que a LCR. Pelo fato de a LCR ser semiautomatizada, seu custo aumenta. Se a PCR for realizada in house, torna-se ainda mais barata. Porém, quando comparados seus custos em relação às técnicas padrão utilizadas hoje, observamos que existem diversas vantagens na utilização de técnicas moleculares para a detecção do *M. tuberculosis*.

Apesar destas técnicas ainda não estarem apropriadas para substituir a cultura, podem ser utilizadas como ferramentas auxiliares no diagnóstico da tuberculose, desde que utilizadas com rigoroso controle de qualidade.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, B. A.; HANSEN, E. B. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *M. tuberculosis*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 57, n. 1, p. 2481-2488, jul. 1989.

ASSIS, N. C. S. et al. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. **J. Bras. Patol. e Med. Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 1-7, fev. 2007.

AUSINA, V. et al. Evaluation of the semiautomated Abbott LCx *M. tuberculosis* Assay for direct detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, p. 1996-2002, 1997.

BAZZO, M. L. et al. Relação entre a qualidade de amostras de escarro e o diagnóstico de micobactérias por PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL, 38, 2004, Florianópolis. **Anais Eletrônico...** Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

BIERRENBACH, A. L. et al. Incidência de tuberculose e taxa de cura, Brasil, 2000 a 2004. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, supl. 1, p. 24-33, set. 2007.

BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 281-286, jun. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Avaliação epidemiológica e operacional do Programa Nacional de Controle da Tuberculose 2005. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005.

BRISSENO-NOËL, A. et al. Rapid diagnoses of *tuberculosis* by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. **Lancet**, Paris, v. 1, n. 1. p. 1069-1071, set. 1989.

BURKARDT, H. J. Standardization and quality control of PCR analysis. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin, v. 38, n. 2, p. 87-91, jul. 2000.

CHAUHAN, D. S. et al. Molecular typing of *M. tuberculosis* isolates from different parts of Índia base don IS6110 element polymorphism using RFLP analysis. **Indian J. Med. Res.**, Nova Deli, v. 125, p. 577-581, abr. 2007.

CLARRIDGE, J. E. et al. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *M. tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, n. 5, p. 2049-2056, mai. 1993.

FOUNTAIN, F. F. *Tuberculosis* update. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 94, p. 117, abr. 2001.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Memória da Tuberculose. Disponível em: <<http://www.coc.fiocruz.br/tuberculose>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

GAMBOA, F. et al. Rapid diagnosis of extrapulmonary *tuberculosis* by ligase chain reaction amplification. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 5, p. 1324-1329, maio 1998.

- GARCÍA, M. Hibridación de ácidos nucleicos: fundamentos e aplicaciones. **Bol. Sanit. Panam.**, Washington v. 109, n. 3, p. 244-257, dez. 1990.
- GARRINO, M. G. et al. Evaluation of the Abbott LCx *M. tuberculosis* Assay for Direct Detection of *M. tuberculosis* Complex in human samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 1, p. 229-232, jan. 1999.
- HELLYER, T. J. et al. Detection of viable *M. tuberculosis* by reverse transcriptase-strand displacement amplification of mRNA. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 3, p. 518-523, mar. 1999.
- HOUWERT, K. A. et al. Prospective evaluation of World Health Organization criteria to assist diagnosis of tuberculosis in children. **Eur. Respir. J.**, Londres, v. 11, p. 1116-1120, 1998.
- IEVEN, M.; GOOSENS, H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 10, p. 242-256, mar. 1997.
- JOUVESHOMME, S. et al. Clinical utility of an amplification test based on ligase chain reaction in pulmonary tuberculosis. **Am. J. Crit. Med.**, Paris, v. 158, p. 1096-1101, jan. 1998.
- KATARIA, Y. P. Observations on human infection with *Mycobacterium bovis*. **Tub. Lung. Dis.**, Nova Iorque, v. 50, n. 1, p. 14-21, mar. 1969.
- KIRSCHNER, P. et al. Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-month prospective study. **J. Clin. Microbiol.**, Washington v. 34, n. 5, p. 304-312, maio 1996.
- KONEMAN, E. et al. **Mycobacteria**. Filadélfia: JB Lippincott Co, 2000.
- KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, Londres, v. 339, p. 237-238, jan. 1989.
- LAFHER, T. G.; CARRINO, J. J.; MARSHALL, R. L. The ligase chain reaction in DNA-based diagnosis. **Ann. Biol. Clin.**, Paris, v. 50, n. 5, p. 821-826, maio/jun. 1993.
- LEITE, O. H. M. et al. **Guia para diagnóstico, tratamento e prevenção da tuberculose**. São Paulo, SP: Hospital das Clínicas FMUSP, 2006.
- LJUNGQVIST, L. et al. Affinity purification, biological characterization and serological evaluation of defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. **Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 41, n. 3, p. 333-335, set. 1990.
- LUMB, R. et al. Multicenter evaluation of the Abbott LCx *M. tuberculosis* ligase chain reaction assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3102-3107, out. 1999.
- MARTINS, L. C. et al. Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 33, n. 3, p. 253-257, maio/jun. 2000.
- MOKADDAS, E.; AHMAD, S. Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of *M. tuberculosis* complex members from non-tuberculous microbacteria. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 60, p. 140-144, abr. 2007.
- MONATGNE, J. R. L.; SNIDER, J. D. E. The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 World Congress on Tuberculosis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 169, p. 1189-1196, ago. 1994.
- MOORE, D. F.; CURRY, J. I. Detection and identification of *M. tuberculosis* directly from sputum sediments by ligase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 4, p. 1028-1031, abr. 1998.
- NASCIMENTO, D. R. **As pestes do século XX: tuberculose e Aids no Brasil, uma história comparada**. Rio de Janeiro, RJ: Fiocruz, 2005.
- NOLTE, F. S. et al. Direct detection of *M. tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, n. 5, p. 1777-1782, maio 1993.
- NOORDHOEK, G. T. et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *M. tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n. 1, p. 277-284, jan. 1994.
- OGUSKU, M. M. et al. PCR in the diagnosis of cutaneous tuberculosis. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 165-170, abr./jun. 2003.
- OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I. Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no estado do Amazonas. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 343-349, jul./ago. 2004.
- PIERSIMONI, C. et al. Comparative evaluation of the new Gen-Probe *M. tuberculosis* Amplified Direct Test and Assay for Direct Detection of *M. tuberculosis* Complex in respiratory and extrapulmonary specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 12, p. 3601-3604, dez. 1998.
- PINTO, H. J. et al. Detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas por reação em cadeia da polimerase utilizando primers baseados na região intergênica plcB-plcC. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 437-442, jul./ago. 2007.
- RODRIGUES, L. et al. Resposta brasileira à tuberculose:

contexto, desafios e perspectivas. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, supl.1, p. 1-2, set. 2007.

SCHROEDER, E. K. et al. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 3, n. 3, p. 197-225, set. 2002.

SILVA, C. F. et al. hsp65 PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of micobactéria in the clinical laboratory. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 25-28, jan./fev. 2001.

SOINI, H. et al. Detection and Identification of mycobacterial by amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, n. 2, p. 2025-2028, fev. 1992.

SOUZA, S. S.; SILVA, D. M. G. V. Grupos de Convivência: contribuições para uma proposta educativa em Tuberculose. **Rev. Bras. Enferm.**, Brasília, v. 60, n. 5, p. 590-595, set/out. 2007.

STANLEY, E. C. et al. Development of a new, combined

rapid method using Phage and PCR for detection and identification of viable *M. paratuberculosis* bacteria within 48 hours. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 6, p. 1851-1857, mar. 2007.

TORTOLI, E.; LAVINIA, F.; SIMONETTI, M. T. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *M. tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, p. 2424-2426, 1997.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU. PCR - Polymerase Chain Reaction - O Filme. Disponível em: <<http://www.fob.usp.br/nied/pcr.htm>>. Acesso em: 04 maio 2008.

YZQUIERDO, S. L. S. et al. Aplicación de RPC-PLFR em el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas. **Rev. Chil. Infectol.**, Santiago, v. 24, n. 5, p. 391-396, out. 2007.

Recebido em: 10 Fevereiro 2009

Aceito em: 25 Junho 2009