

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS**  
**MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS**  
**INFECCIOSAS**

**LEONARDO BRUNO PAZ**

**FERREIRA BARRETO**

**COMPARAÇÃO DO**  
***MYCOBACTERIUM***  
**COM MÉTODOS DE**  
**DETECÇÃO DE**  
***TUBERCULOSIS* EM**  
**RESPIRATÓRIOS DE**  
**POSITIVO**

***TESTE AMPLIFIED***  
***TUBERCULOSIS DIRECT***  
**REFERÊNCIA PARA**  
***MYCOBACTERIUM***  
**ESPÉCIMES**  
**PACIENTES HIV**

**COMPARAÇÃO DO TESTE *AMPLIFIED*  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DIRECT* COM  
MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA DETECÇÃO DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM ESPÉCIMES  
RESPIRATÓRIOS DE PACIENTES HIV POSITIVO**

**LEONARDO BRUNO PAZ FERREIRA BARRETO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, área de concentração em Doenças Infecciosas, no Instituto de Pesquisa Evandro Chagas para obtenção de grau de Mestre em Ciências, sob a orientação da Dr<sup>a</sup> Valéria Cavalcanti Rolla e da Dr<sup>a</sup> Gisele Huf.

Rio de Janeiro, 2011

# LEONARDO BRUNO PAZ FERREIRA BARRETO

## COMPARAÇÃO DO TESTE *AMPLIFIED MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DIRECT* COM MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM ESPÉCIMES RESPIRATÓRIOS DE PACIENTES HIV POSITIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, área de concentração em Doenças Infecciosas, no Instituto de Pesquisa Evandro Chagas para obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr<sup>a</sup> Valéria Cavalcanti Rolla e Dr<sup>a</sup> Gisele Huf.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

---

Dr<sup>a</sup>. Mônica Bastos de Lima Barros (Presidente/Revisora)

---

Dr. Rafael Silva Duarte (Membro)

---

Dr. José Ueleres Braga (Membro)

---

Dr<sup>a</sup>. Carolina Arana Stanis Schmaltz (Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas pela possibilidade de execução do estudo.

À pesquisadora Maria Cristina da Silva Lourenço por participar ativamente na minha formação profissional, como mentora e modelo, além de idealizadora do estudo.

Às pesquisadoras Dras. Gisele Huf e Valéria C. Rolla pela orientação, apoio e paciência.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do IPEC pela qualidade, seriedade e organização nas suas atividades diárias, tornando possível a realização do estudo.

À minha esposa, fonte de paciência eterna, pelo apoio incondicional.

À minha filha Clara pela inspiração e motivação.

Barreto, L B P F. **Comparação do teste *Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct* com métodos de referência para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em espécimes respiratórios de pacientes HIV positivo.** Rio de Janeiro 2011. 47 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

O diagnóstico rápido da tuberculose (TB) é fundamental para a redução da taxa de transmissão da doença e conseqüentemente do número de pessoas infectadas pelo indivíduo doente além de possibilitar a prevenção do óbito e as seqüelas causadas pela progressão da doença sem tratamento. A baciloscopia possui baixa sensibilidade e o maior problema da cultura para micobactérias é o longo tempo de incubação necessário, até oito semanas. Novos testes, apesar do custo elevado, podem representar um avanço no combate à doença. O teste *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct* (MTD; Gen-Probe; San Diego, CA) é capaz de detectar o rRNA do complexo *M. tuberculosis* em aproximadamente 3 horas, porém é necessário um melhor entendimento da *performance* deste teste para clientela paucibacilar, que é o caso de pacientes HIV positivo, já que a qualidade de suas amostras normalmente dificulta o diagnóstico laboratorial tanto pela baciloscopia quanto pela cultura. Este estudo foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz e tem como objetivo comparar o teste *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct* com métodos de referência para o diagnóstico laboratorial de tuberculose em pacientes HIV positivo na forma de um estudo retrospectivo de acurácia diagnóstica comparando os resultados do MTD com cultura em LJ e BACTEC MGIT 960. Foram analisadas amostras respiratórias de 118 pacientes, 74,4% do sexo masculino, e idade média de  $36,61 \pm 10,6$  anos. O MTD identificou 31% das amostras como complexo *M. tuberculosis* (M.tb). Entre as culturas em BACTEC MGIT 960, 29,7% foram isolados como M.tb e as culturas em LJ isolaram 27,1%. A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) encontrados em relação ao LJ foram de 87,5%, 89,4%, 83,8% e 95% respectivamente. Em relação ao MGIT, o MTD estimou os valores de 88,6%, 75,7%, 83,8% e 94,8% respectivamente. O MTD na população estudada se mostrou sensível, específico, possibilitou o diagnóstico precoce em um maior número de pacientes e permitiu a exclusão do diagnóstico de TB em outros, o que nem sempre é possível de forma rápida na prática clínica diária.

**Palavras-chave:** amplificação de ácidos nucleicos, espécimes respiratórios, acurácia, procedimentos e técnicas diagnósticas.

Barreto, L B P F. **Comparison of Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct test with reference methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens of HIV positive patients.** Rio de Janeiro 2011. 47 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## ABSTRACT

Rapid diagnosis of tuberculosis (TB) is important to reduce the rate of disease transmission and the number of infected people, enabling prevention of death and sequel caused by disease progression without treatment. The bacilloscopy has low sensitivity and mycobacteria culture takes long incubation time, up to eight weeks. New tests, despite the high cost, may represent a breakthrough in combating the disease. The Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test (MTD, Gen-Probe, San Diego, CA) is capable of detecting the rRNA of the *M. tuberculosis* in about 3 hours, but a better understanding of the performance of this test in paucibacillary clientele is needed, which is the case of HIV positive patients, since the quality of their samples usually difficult both for the laboratory diagnosis by smear and culture. This study was conducted at the Laboratory of Bacteriology and bioassays of the Clinical Research Institute Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, and aims to compare the Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test with reference methods for the laboratory diagnosis of tuberculosis in HIV positive patients with a retrospective study of diagnostic accuracy by comparing the results of MTD with LJ and BACTEC MGIT 960. We analyzed respiratory samples from 118 patients, 74.4% male, mean age  $36.61 \pm 10.6$  years. MTD identified 31% of the samples as the *M. tuberculosis* (Mtb). Among the cultures in BACTEC MGIT 960, 29.7% were isolated as *M. tuberculosis* cultures and in LJ, 27.1% were isolated. The sensitivity, specificity, positive predictive values (PPV) and negative (NPV) found in relation to LJ were 87,5%, 89,4%, 83,8% and 95% respectively. Regarding the MGIT, the MTD estimated values of 88,6%, 75,7%, 83,8%, and 94,8% respectively. MTD in this population was sensitive, specific, enabled early diagnosis in a greater number of patients and allowed the exclusion of diagnosis of TB in others, which is not always possible in a fast way in daily clinical practice.

**Keywords:** nucleic acid amplification; respiratory specimens; accuracy; diagnostic techniques and procedures.

## LISTA DE QUADRO, TABELAS E FIGURAS

Quadro 1 - Testes de amplificação de ácidos nucléicos comerciais	17
Tabela 1 - Resultados das culturas em BACTEC MGIT 960TB e LJ	31
Tabela 2 - Resultados das identificações bioquímica das culturas em LJ e BACTEC MGIT 960	31
Tabela 3 - Comparação entre os resultados dicotomizados da Baciloscopia e os resultados do MTD	32
Tabela 4 - Acurácia do MTD em amostras com baciloscopia negativa	32
Tabela 5 - Acurácia do MTD em amostras respiratórias	33
Figura 1 – Fluxo de processamento das amostras	34
Figura 2 – Diagrama do estudo	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	- Bacilo Álcool Ácido Resistente
CD4	- Linfócito T CD <sub>4</sub>
CDC	- <i>Centers of Disease Control</i>
cM.tb	- complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CONSORT	- <i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i>
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HPA	- <i>Hybridization Protection Assay</i>
I.C.	- Intervalo de Confiança
IPEC	- Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
LAMP	- <i>Loop mediated isothermal amplification</i>
LJ	- Lowenstein Jensen
M.tb	- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MGIT	- <i>Mycobacterium Growth Indicator Tube</i>
MOTT	- <i>Mycobacterium Other Than Tuberculosis</i>
MTD	- <i>Amplified Mycobacterium Direct Test</i>
N	- Número de amostras
OMS/WHO	- Organização Mundial de Saúde / World Health Organization
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i>
RLU	- <i>Relative Light Units</i>
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNApol	- RNA polimerase
Rrna	- RNA ribossomal
RV	- Razão de Verossimilhança
STARD	- <i>STAndards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies</i>
TB	- Tuberculose
TMA	- <i>transcription-Mediated Amplification</i>
TR	- Transcriptase Reversa



VPN - Valor Preditivo Negativo  
VPP - Valor Preditivo Positivo

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>11</b>
1.1 Epidemiologia.....	11
1.2 Co-infecção TB/ HIV.....	14
1.3 Diagnóstico da tuberculose.....	15
1.4 Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy Studies (STARD).....	19
1.5 Justificativa.....	19
<b>2. Objetivo Geral.....</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivo Específico.....	21
<b>ARTIGO: Comparação do teste <i>Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct</i> com métodos de referência para detecção de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em espécimes respiratórios de pacientes HIV positivo .....</b>	<b>22</b>
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	28
TABELAS.....	31
FIGURAS.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
<b>3. CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>
<b>5. ANEXOS.....</b>	<b>45</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. EPIDEMIOLOGIA

Apesar de mais de um século da descoberta do agente etiológico da tuberculose (TB): *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb) realizada por Robert Kock (1882), ela continua sendo um problema de saúde pública de âmbito mundial.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 8,8 milhões de casos novos de tuberculose (TB) ocorreram em 2010 (equivalente a 128 casos por 100000 habitantes). Em 2010, 6,2 milhões de pessoas foram diagnosticadas com TB. Destes casos, 5,4 milhões tiveram TB pela primeira vez e 0,3 milhões tiveram episódios recorrentes de TB após terem sido curados de TB no passado (WHO, 2011b).

A maioria dos casos estimados em 2010 ocorreu na Ásia (59%) e na África (26%). Em proporções menores, casos no Mediterrâneo (7%), Europa (5%) e nas Américas (3%). O Brasil faz parte do grupo de 22 países que tem sido considerado de alta prioridade global desde 2002 para o controle da TB. Juntos apresentam 81% dos casos incidentes estimados no mundo. Estima-se que a Índia e a China contribuam com cerca 38% de todos os casos TB do mundo (WHO, 2011b).

Em 2009, dos 4,6 milhões de novos casos de tuberculose pulmonar reportado a Organização Mundial de Saúde, 43% foram diagnosticados sem confirmação microbiológica (WHO, 2010), o que pode levar a um diagnóstico incorreto da doença e, conseqüentemente, tratamento inadequado. Em 2010, dentre os novos casos de TB pulmonar, 2,6 (57%) milhões possuíam baciloscopia positiva e 2 milhões baciloscopia negativa (WHO, 2011b).

Em estudos de história natural da doença, estima-se que 70% dos pacientes com TB pulmonar não tratada, HIV negativo e baciloscopia positiva morrem em até 10 anos. Dentre os que possuem cultura positiva e baciloscopia negativa, 20% morrem em até 10 anos (TIEMERSMA *et al.*, 2011).

Estima-se 12 milhões de casos prevalentes de TB em 2010, o que equivale a 178 casos por 100.000 mil habitantes. Globalmente, a prevalência tem diminuído desde 1990 acelerando a queda após 1997 (WHO, 2011b).

A TB é uma das principais causas de morte em todo o mundo. A taxa global de mortes por TB (incluindo óbitos em pacientes soropositivos para o HIV) aumentou durante a década de 1990, sendo esta tendência revertida por volta do ano de 2000 e estando agora em declínio. Mesmo assim, estima-se que 1,4 milhões de pessoas morreram de TB e 1,1 milhão de pacientes soronegativos para o HIV morreram de TB em 2010, o que equivale a 15 mortes por 100.000 habitantes e mais 0,35 milhões de óbitos relacionados à TB em pacientes soropositivos para o HIV. Estima-se que o número de mortes por TB chega a 20 por 100.000 pessoas (WHO, 2011b).

A infecção pelo HIV acomete no mundo 33,3 milhões de pessoas com 2,6 milhões de casos novos, a maioria delas residentes na África subsaariana e Ásia. Alguns países do leste europeu e Ásia central apresentaram um aumento no número de casos incidentes (UNAIDS, 2010; WHO, 2011a).

A epidemia de HIV nas Américas do Sul e Central apresentaram pouca mudança em seus números nos últimos anos. O total do número de pessoas vivendo com HIV continuam a crescer com a estimativa de 1,4 milhões em 2009. Cerca de um terço de toda a população HIV positivo residente nas Américas do Sul e Central vivem no Brasil. A prevalência de HIV em adultos no Brasil continua abaixo de 1% (UNAIDS, 2010).

Estima-se que 630 mil brasileiros vivam com AIDS. Em 2010 foram 34212 casos novos, taxa de incidência de 17,9 por 100.000 habitantes. Neste mesmo ano o país teve 11965 óbitos. A região sudeste concentra 56,4% dos casos novos, mas vem reduzindo a taxa de incidência ao longo dos anos. As Regiões Norte, Nordeste e Sul apresentaram um aumento da incidência. Apesar de ter 14,4% da população, o Sul tem cerca 23% dos casos de AIDS. Centro-Oeste apresenta tendência de estabilização. A epidemia encontra-se nos grandes centros, entretanto avançam em direção as cidades menores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011a, 2011b).

A pandemia do HIV teve um grande impacto na incidência e prognóstico da TB, principalmente em países com poucos recursos, ao mesmo tempo, a TB está fortemente associada ao HIV por ser uma das mais freqüentes doenças oportunistas associadas à Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (BONNET *et al.*, 2006; CORBETT *et al.*, 2003; HAVLIR; BARNES, 1999).

Em 2009 de 9,4 milhões de casos novos de TB, 1,2 milhão ocorre em soropositivos para HIV. De 1,7 milhões de pessoas que morreram de TB, 400.000

(24%) possuíam HIV. Dos 1,8 milhões de mortes relacionadas ao HIV, 22% foram associadas a TB (WHO, 2011a). Em 2010, 13% de todos os casos novos de TB no mundo ocorreram na população HIV positivo e 360.000 pessoas morreram pela co-infecção TB-HIV (UNAIDS, 2011; WHO, 2011b).

No Brasil, a tuberculose ainda ocupa um lugar indesejado na saúde pública e encontra-se no 19º lugar entre os 22 países que concentram 80% dos casos estimados no mundo. Com relação à incidência, o Brasil é o 108º colocado. O Brasil reduziu de 73.673 para 70.601 o número de casos novos de tuberculose entre 2008 e 2010. Com a redução, a taxa de incidência baixou de 38,82 para 37,99. São números positivos, mas que ainda fazem da tuberculose um dos principais problemas de saúde pública do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011c).

Entre 2002 e 2009, houve aumento do percentual de pacientes com tuberculose que fizeram testes de detecção do HIV. Como a tuberculose é a principal causa de morte de pessoas com HIV, quanto mais precoce o diagnóstico, melhores as chances de sobrevivência do paciente. Atualmente, a comorbidade TB-HIV ocorreu em 9,2% dos casos. No país, a tuberculose é a terceira causa de óbitos por doenças infecciosas e a primeira entre pacientes com AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011c).

De acordo com os dados do Ministério da Saúde, em 2010, as maiores incidências estão nos estados do Rio de Janeiro (71,8 por 100 mil habitantes), Amazonas (69,2/100 mil), Pernambuco (47,5/100 mil), Pará (46,2/100 mil) e Rio Grande do Sul (45,3/100 mil). As menores taxas de incidência do país foram registradas no Distrito Federal (11,7/100 mil), Tocantins (13,6/100 mil) e Goiás (14,6/100 mil). Entre as capitais, as maiores incidências são registradas em Porto Alegre (111,3/100 mil), Recife (97,2/100 mil), Belém (95,1/100 mil), Rio de Janeiro (93,4/100 mil) e Manaus (93,2/100 mil) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011c).

No município do Rio de Janeiro, de 2001 a 2006, houve uma redução de 13,7% no total de casos novos. Em 2006 foram 5.704 casos novos de TB no município do Rio de Janeiro, com uma incidência de 93,7/100.000 habitantes, sendo 4.855 destes casos de TB pulmonar, com uma incidência de 79,1/100.000 habitantes (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2008).

Cada indivíduo que possui tuberculose em atividade infecta de 10 a 15 pessoas em um ano (WHO, 2010). Estima-se que a cada 10 pessoas que entram

em contato com o bacilo da tuberculose, pelo menos 01 desenvolve a doença e que nos pacientes HIV positivos esse risco aumenta em 20 a 40 vezes (WHO, 2004).

Estudos que analisaram a sobrevida em indivíduos com HIV/TB demonstraram maior risco de morte nestes pacientes do que naqueles sem TB (WHALEN, C. C. *et al.*, 2000; WHALEN, C. *et al.*, 1997, 1995, 1996). Sem tratamento e profilaxia, o indivíduo HIV positivo aumenta em 20-30 vezes a chance de desenvolver TB ativa durante a vida se comparado ao HIV negativo (UNAIDS, 2011).

Para a redução de até a metade da mortalidade na população TB-HIV, necessita-se do aumento da taxa de cura de 70% para 80%, detecção de pelo menos 80% dos casos de TB nesta população e profilaxia com isoniazida em até no mínimo 30% da população HIV. A UNAIDS recomenda a realização de triagens regulares em países com alta prevalência de HIV e TB, além da disponibilização de métodos diagnósticos e algoritmos mais sensíveis e específicos (UNAIDS, 2011).

## **CO-INFECÇÃO TB/ HIV**

A tuberculose no contexto da infecção pelo HIV possui características peculiares. O sucesso desta associação relaciona-se aos mecanismos imunológicos. O vírus da família *Retroviridae* (HIV) tem tropismo pelos receptores de membrana CD4, linhagens de linfócitos T auxiliares e células de linhagem macrófago/monócito (PANTALEO *et al.*, 1993). A capacidade do HIV infectar e debilitar os linfócitos favorece a susceptibilidade às infecções oportunistas. A queda dos linfócitos T associada à insuficiência de fatores ativadores de macrófagos (interferon gama) impossibilita os macrófagos de atuarem. Os indivíduos que estão co-infectados com os bacilos em dormência podem desenvolver a doença. Forma-se então o quadro favorável visto que o controle da TB depende de mecanismos celulares (KRITSKI, A. L. *et al.*, 1998; PANTALEO *et al.*, 1993; WAHL *et al.*, 1999).

A co-infecção TB/HIV associada à baixa detecção de bacilos em espécimes clínicos e baixa efetividade do tratamento anti-TB, por abandono de tratamento face aos efeitos adversos, problemas sócio-econômicos, interações medicamentosas e

outras dificuldades nestes indivíduos, aumentam sensivelmente a transmissão e favorece a ocorrência de resistência aos fármacos anti-TB (WHO, 2004).

## 1.2. DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

O diagnóstico rápido da TB é importante para se reduzir a transmissão da doença com conseqüente diminuição do número de pessoas infectadas pelo indivíduo doente.

Na última década, os exames laboratoriais para detecção do *Mycobacterium tuberculosis* evoluíram sensivelmente (NYENDAK *et al.*, 2009). As novas técnicas, como a amplificação de ácidos nucléicos e sistemas automatizados utilizando cultura em meio líquido, possuem elevado custo e dependem de técnicas sofisticadas que as tornam inadequadas para uso rotineiro em países pobres. Entretanto, mesmo em países em desenvolvimento como no Brasil, onde tais tecnologias poderiam ser utilizadas no sistema público e a TB é endêmica, o diagnóstico da TB tem sido baseado apenas na suspeita clínica, exame radiológico do tórax e exame baciloscópico do escarro (CONDE, M. B. *et al.*, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Apesar da baciloscopia do escarro possuir baixa sensibilidade de 40 a 60%, permanece como um dos exames mais importantes para o diagnóstico de TB, pois detecta os pacientes que apresentam maior chance de infectar a comunidade. No Brasil, a baciloscopia do escarro possui um alto valor preditivo positivo (CONDE, M. B. *et al.*, 2009).

Na maioria dos países em desenvolvimento e pobres, na prática, a cultura para micobactérias, cuja sensibilidade é maior que a baciloscopia no diagnóstico de TB pulmonar, é realizada em meio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ). O maior problema da cultura em LJ é o longo tempo de incubação (2 a 8 semanas) e o teste de sensibilidade é realizado a partir da cultura e não do espécime clínico, o que requer várias semanas adicionais para a obtenção dos resultados. Entretanto é considerado padrão ouro (CONDE, M. B. *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, os CDC (Centers for Disease Control) têm recomendado o uso do sistema BACTEC MGIT 960TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, Sparks, Md, USA), um método de cultura automatizado não radiométrico

que apresenta equipamentos de monitoramento contínuo com capacidade para 960 testes simultâneos. Esta metodologia utiliza o tubo MGIT (*Mycobacterium Growth Indicator Tube*) que contém meio Middlebrook 7H9 com sais de rutênio marcados com fluorocromo. Uma célula fotoelétrica coleta os dados de fluorescência de cada tubo a cada 60 minutos. Devido a uma reação de oxi-redução provocada pelo consumo de oxigênio ocorre o aumento da fluorescência e o tubo é sinalizado como positivo pelo equipamento. Para confirmação presuntiva da presença de micobactérias no MGIT, realiza-se baciloscopia de uma alíquota do caldo para a detecção de BAAR. Caso não haja alteração nos níveis de fluorescência no final de 42 dias o tubo é sinalizado como negativo. Este método automatizado aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), proporciona um resultado confiável de diagnóstico de TB e de TSA, em espaço de tempo inferior ao meio sólido em LJ (BECKTON DICKINSON, 1998).

Avanços no campo da biologia molecular têm gerado novas técnicas para o diagnóstico de infecções por meio da detecção de seqüências nucleotídicas específicas dos microrganismos (NYENDAK *et al.*, 2009).

O PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é a mais comum técnica de amplificação de ácidos nucléicos. Hoje existem testes “*in-house*” baseados em protocolos desenvolvidos por laboratórios não comerciais. Há algumas técnicas de amplificação de ácidos nucléicos e cada uma delas utiliza um método diferente para amplificar regiões específicas dos DNA /RNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (LING *et al.*, 2008).

As técnicas de amplificação de ácidos nucléicos têm como alvo seqüência específicas de microrganismos e surgiram como promissores instrumentos para o diagnóstico da TB sensível ou resistente, já que podem detectar e identificar o complexo *Mycobacterium tuberculosis* rapidamente, precedendo o resultado da cultura em semanas. Até o momento existem alguns testes disponíveis comercialmente: Gen-Probe Amplified M. tuberculosis Direct (MTD), Roche Amplicor MTB (Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey), e BD-ProbeTec (SDA) (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, Maryland, USA). A Roche ainda possui uma versão automatizada, COBAS Amplicor e a Becton Dickinson produziu uma nova versão do teste SDA (BD-ProbeTec-ET) (CDC, 2000). Outra metodologia para amplificação de ácidos nucléicos é o teste *Loop-mediated Isothermal*



*Amplification* (LAMP, Eiken Chemical Co. Ltd. Tokyo, JAPAN) (NOTOMI *et al.*, 2000).

Os CDC recomendam que as técnicas de amplificação de ácido nucléico sejam realizadas em pelo menos uma amostra de escarro de todos os pacientes suspeitos de tuberculose (CDC, 2009).

O FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso de alguns destes testes e apenas para espécimes respiratórios. Posteriormente o MTD e o Amplicor foram liberados para uso em amostras com baciloscopia positiva (CDC, 1996) e a segunda geração do MTD para baciloscopia negativa (CDC, 2000). Até 2008, os testes BD-ProbeTec-ET e LAMP não possuíam aprovação para uso pelo FDA (LING *et al.*, 2008).

No quadro 01 pode-se verificar um resumo sobre as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos (NAAT).

Quadro 1 - Resumo dos testes de amplificação de ácidos nucléicos comerciais:

Técnicas de amplificação de ácidos nucléicos	Fabricante	Método
MTD	Gen-Probe Inc. San Diego, CA, EUA	Amplificação transcrição mediada de Rna
Amplicor MTD	Roche Molecular Systems Branchburg, NJ, EUA	Amplificação por PCR do rRNA 16s
Cobas Amplicor	Roche Diagnostic Systems Mannheim, Alemanha	Amplificação por PCR do rRNA 16s
BD ProbeTec Direct	Becton Dickinson Diagnostic Systems Sparks, MD, EUA	Amplificação de IS6110 e rRNA 16S por deslocamento de fita
LAMP	Eiken Chemical Co. Ltd. Tokyo, Japão	Amplificação isotérmica e leitura por fluorescência UV

Fonte: Ling *et al.*, 2008.

Alguns destes testes foram aprovados para uso na 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). Em amostras com baciloscopia positiva a sensibilidade destes métodos é cerca 96% (GRECO *et*

*al.*, 2006), já em baciloscopia negativa varia de 66 a 72% (GRECO *et al.*, 2006; SARMIENTO *et al.*, 2003).

O MTD utiliza métodos TMA (*transcription-Mediated Amplification*) e HPA (*Hybridization Protection assay*) para detectar qualitativamente o rRNA das micobacterias do complexo *M. tuberculosis*. Este processo ocorre em duas fases (amplificação e detecção) no mesmo tubo. Primeiro, a sonicação provoca a extração dos ácidos nucleicos das micobactérias. Estes são estabilizados e levados a temperatura de 95°C para desnaturar e romper a estrutura secundária do rRNA. O método de amplificação TMA usa dois primers e duas enzimas: RNA polimerase (RNA pol.) e transcriptase reversa (TR). Um dos primers contém a seqüência promotora para RNA pol. Na primeira etapa da amplificação, o “primer-promotor” hibridiza ao RNA alvo em região definida. A TR polimeriza uma cópia de DNA do RNA hibridizado. Este RNA é degradado graças a atividade RNAase H da TR. O segundo primer se liga a cópia de DNA e por ação da TR gera nova fita de DNA complementar a primeira. A RNA pol. reconhece a seqüência promotora na fita molde de DNA e inicia a transcrição. Cada novo amplicon de RNA que é formado neste processo entra novamente no processo TMA e serve como modelo para um novo ciclo de replicação, levando a uma expansão exponencial dos amplicons. Desde que cada fita molde de DNA possa originar de 100-1000 cópias de RNA, esta expansão pode gerar cerca de 10 bilhões de amplicons em menos de uma hora. Todo o processo é autocatalítico e ocorre na mesma temperatura (42°C). As seqüência de amplicons de RNA são detectadas em seguida pelo método HPA (ARNOLD JR *et al.*, 1989). O processo se inicia com a adição de sondas monocatenárias conjugadas com um marcador quimioluminescente, que se ligam especificamente as cópias dos amplicons (complementar) formando, híbridos estáveis RNA-DNA. Um processo químico é usado para distinguir entre sondas hibridizadas e não hibridizadas. A etapa final da técnica ocorre no luminômetro, que automaticamente injeta os reagentes de detecção em quantidades adequadas no tubo contendo as sondas hibridizadas, estas emitem sinais luminosos que são medidos e quantificados pelo equipamento na forma de RLU (*relative light units*) (GEN-PROBE INCORPORATED, 2007).

Atualmente, existem novos testes diagnósticos comerciais como o sistema automatizado GenXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) e os *line probe assays*

GenoType MTBDRplus e GenoType Mycobacteria Direct (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha). Entretanto, estudos futuros devem demonstrar se estes testes rápidos podem ser alternativos aos testes convencionais para o diagnóstico da TB.

### 1.3. STANDARDS FOR THE REPORTING OF DIAGNOSTIC ACCURACY STUDIES (STARD)

Em 1999, no encontro *Cochrane Colloquium* em Roma, o *Cochrane Diagnostic and Screening Test Methods Working group* discutiu a baixa qualidade metodológica e a falta de padronização nas publicações de testes diagnósticos. O grupo de trabalho percebeu que o primeiro passo para a correção destes problemas seria a melhora da qualidade na publicação dos estudos diagnósticos. Seguindo o sucesso da iniciativa CONSORT, o grupo de trabalho sugeriu o desenvolvimento de um *checklist* de itens que devem ser incluídos nas publicações de um estudo de acurácia diagnóstica. O Objetivo da iniciativa STARD é melhorar a qualidade das publicações de estudos de acurácia diagnóstica, permitir que os leitores tenham ciência dos vieses que possam ter ocorrido nos estudos (validade interna) e avaliar a generabilidade (validade externa). O STARD *statement* consiste de um *checklist* de 25 itens e recomenda o uso de um fluxograma que descreve o desenho do estudo e o fluxo de pacientes (BOSSUYT *et al.*, 2003; STARD, 2011).

Este trabalho foi organizado segundo as recomendações do STARD.

### 1.4. JUSTIFICATIVA

A infecção pelo HIV é um dos principais fatores de risco para o adoecimento por tuberculose, devido a alterações imunológicas que a mesma determina, criando condições favoráveis para a ativação da infecção tuberculosa e desenvolvimento da doença (CASTELO FILHO *et al.*, 2004).

Os testes de identificação existentes são plenamente confiáveis e de baixo custo, no entanto, não proporcionam resultado rápido. Nestas situações,

freqüentemente os pacientes portadores de TB (principalmente aqueles internados em hospitais, infectados pelo HIV e/ou portadores de co-morbidades) fizeram uso de esquema inapropriado e/ou evoluíram para óbito antes que o tratamento específico pudesse ser instituído (KEELER *et al.*, 2006).

Usualmente, quando os kits diagnósticos são autorizados para utilização e comercialização pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) dos EUA ou por organismos regulatórios europeus, os órgãos regulatórios de países em desenvolvimento tendem a prover o registro para a comercialização, desde que no instrumento de uso (bula) sejam incluídos os mesmos itens constantes dos produtos comercializados no país de origem. Entretanto, tem sido proposto que antes da liberação do registro, sua alocação no mercado nacional e principalmente sua incorporação pelo Sistema SUS, os novos métodos diagnósticos relacionados a enfermidades de impacto para a saúde pública devam ser submetidos a uma avaliação de sua *performance* (KRITSKI, A. *et al.*, 2000).

O MTD detecta todos os microrganismos do complexo *M. tuberculosis* em até 3 horas e meia. Este complexo é constituído pelas sub-espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. pinnipedii*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canettii* e *M. caprae* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). No entanto, o *M. africanum* é responsável pela tuberculose pulmonar na África Tropical, o *M. microti* infecta apenas animais, o *M. pinnipedii*, o *M. Capra* e o *M. bovis* raramente são transmitidos dos animais para o homem. Desta forma, *M. tuberculosis* é o mais comum, sendo responsável por uma morbidade significativa no mundo inteiro (GEN-PROBE INCORPORATED, 2007).

A elaboração de políticas públicas de saúde deve ser amparada na melhor evidência possível acerca das ferramentas disponíveis.

Não há dados que demonstrem a efetividade do MTD em amostras de pacientes HIV positivo em nosso meio ou permitam avaliar a sua *performance* em indivíduos com TB paucibacilar. Estas informações são fundamentais na elaboração de políticas públicas e, portanto podem contribuir esclarecendo sobre o uso do MTD para esta clientela que necessita de uma detecção rápida e confiável para o diagnóstico da tuberculose, visando o tratamento precoce e efetivo da doença.

Este estudo tem como objetivo comparar o MTD com os outros métodos de cultura em pacientes HIV positivo, através de um estudo de acurácia diagnóstica em condições reais da prática diária de um laboratório de micobactérias.

## OBJETIVO GERAL

Comparar o teste *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct* com métodos de referência para o diagnóstico laboratorial de tuberculose em pacientes HIV positivo atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas no período de Janeiro de 2008 a Junho de 2009.

### 1.5. OBJETIVO ESPECÍFICO

Obter as medidas de acurácia para o MTD em comparação aos métodos de referência cultura no BACTEC MGIT 960 e no Lowenstein Jensen.

A versão em inglês do manuscrito apresentado a seguir será submetida ao periódico *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. A comprovação de submissão enviada pelo periódico, juntamente com a versão do manuscrito em inglês serão apresentadas à banca examinadora no dia da defesa da dissertação.

**COMPARAÇÃO DO TESTE *AMPLIFIED MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
*DIRECT* COM MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA DETECÇÃO DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM ESPÉCIMES RESPIRATÓRIOS DE  
PACIENTES HIV POSITIVO**

**AUTORES:**

**Leonardo Bruno Paz Ferreira Barreto<sup>1</sup>**

**Valéria Cavalcanti Rolla<sup>1</sup>**

**Maria Cristina da Silva Lourenço<sup>1</sup>**

**Gisele Huf<sup>2</sup>**

**PALAVRAS CHAVE:**

Amplificação de ácidos nucleicos; espécimes respiratórios; acurácia; procedimentos e técnicas diagnósticas.

**Subtítulo:** Detecção de tuberculose em pacientes HIV positivo

**AGRADECIMENTO:**

À equipe do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do IPEC/FIOCRUZ pela qualidade, seriedade e organização nas suas atividades diárias, tornando possível a aquisição dos dados e realização do estudo.

À chefe do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios, Maria Cristina da Silva Lourenço pela idealização do estudo.

À Diretora do IPEC Dra. Valdiléia Veloso responsável pela aquisição do kit MTD.

---

**AFILIAÇÕES:**

<sup>1</sup> INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

<sup>2</sup> INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

## SUMÁRIO

### LOCAL:

O estudo foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz.

### OBJETIVOS:

Comparar o teste *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct* com métodos de referência para o diagnóstico laboratorial de tuberculose em pacientes HIV positivo.

### DESENHO:

Estudo retrospectivo de acurácia diagnóstica comparando os resultados do MTD com cultura em LJ e BACTEC MGIT 960.

### RESULTADOS:

Foram analisadas amostras respiratórias de 118 pacientes, 74,4% do sexo masculino, e idade média de  $36,61 \pm 10,6$  anos. O MTD identificou 31% das amostras como complexo *M. tuberculosis* (M.tb). Entre as culturas em BACTEC MGIT 960, 29,7% foram isolados como M.tb e as culturas em LJ isolaram 27,1%. A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) encontrados em relação ao LJ foram de 87,5%, 89,4%, 75,7% e 95% respectivamente. Em relação ao MGIT, o MTD estimou os valores de 88,6%, 92,4%, 83,8%, e 94,8%.

### CONCLUSÃO:

O MTD na população estudada se mostrou sensível, específico, possibilitou o diagnóstico precoce em um maior número de pacientes e permitiu a exclusão do diagnóstico de TB em outros, o que nem sempre é possível de forma rápida na prática clínica diária.

## INTRODUÇÃO

Apesar de mais de um século da descoberta do agente etiológico da tuberculose (TB), *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb), realizada por Robert Kock, ela

continua sendo um problema de saúde pública de âmbito mundial. Cada indivíduo que possui tuberculose em atividade infecta de 10 a 15 pessoas em um ano [1]. Estima-se que a cada 10 pessoas que entram em contato com o bacilo da tuberculose, pelo menos uma desenvolve a doença e que nos pacientes HIV positivo esse risco aumenta em 20 a 40 vezes [2]. Estudos que avaliaram a sobrevivência em indivíduos com HIV/TB demonstraram maior risco de morte nestes pacientes do que naqueles sem TB [3–6].

O método de isolamento considerado padrão ouro [7] é a cultura para micobactérias em meio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ). Este método tem como limitação o longo tempo de incubação (2 a 8 semanas) mas é utilizado pela maioria dos países em desenvolvimento e pobres na prática clínica devido ao seu baixo custo. O diagnóstico rápido da TB é importante para se reduzir a transmissão da doença com consequente diminuição do número de pessoas infectadas pelo indivíduo doente. Entretanto as técnicas como a amplificação de ácidos nucleicos e sistemas automatizados utilizando cultura em meio líquido possuem elevado custo e dependem de ferramentas sofisticadas, o que as inviabilizam para uso rotineiro em países pobres.

Na última década os exames laboratoriais para detecção do *M.tb* evoluíram sensivelmente [8]. O teste *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct* (MTD; Gen-Probe; San Diego, CA) é capaz de detectar o rRNA do complexo *M. tuberculosis* em aproximadamente 3 horas, porém, ainda é necessário um melhor entendimento da *performance* deste teste para a clientela paucibacilar, que é o caso de pacientes HIV positivo, já que a qualidade de suas amostras habitualmente dificultam o diagnóstico laboratorial tanto pela baciloscopia quanto pela cultura. Este estudo tem como objetivo comparar o MTD com os outros métodos de cultura em pacientes HIV positivo, através de um estudo de acurácia diagnóstica em condições reais da prática diária de um laboratório de micobactérias.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), referência em doenças infecto-contagiosas, dispõe de um ambulatório especializado no



atendimento de pacientes com TB e um laboratório de micobactérias de complexidade nível III. Este é um estudo de acurácia diagnóstica, realizado neste laboratório de bacteriologia, em condições de rotina.

### **População do estudo, critérios de elegibilidade**

Foram incluídas no estudo todas as amostras respiratórias fornecidas por pacientes HIV positivo com suspeita de tuberculose pulmonar encaminhadas para o laboratório no período de Janeiro de 2008 a Junho de 2009. Foram excluídas do estudo todas as amostras coletadas subsequentemente à primeira, fornecidas pelos pacientes incluídos no período do estudo. Foram consideradas amostras respiratórias: escarro, escarro induzido e lavado bronco alveolar.

### **Processamento da amostra e cultura**

Todas as amostras foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen e pesquisa de BAAR direto. Posteriormente foram descontaminadas pelo método de NALC – NaOH, semeadas em três LJ por amostra de acordo com o Guia para o laboratório nível III do CDC [9] , incubados em estufa bacteriológica a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Leituras semanais até a 8ª semana foram realizadas e no caso de ausência de crescimento foram consideradas negativas. Parte do sedimento obtido na descontaminação foi inoculado no MGIT (*Mycobacterium Growth Indicator Tube*) e incubado no BACTEC MGIT 960 de acordo com as instruções do fabricante [10]. No caso de crescimento detectado pelo equipamento, o tubo foi retirado do aparelho e a partir da suspensão (crescimento) confeccionou-se lâmina para baciloscopia, com o objetivo de confirmação da presença de micobactéria, semeadura em ágar sangue como controle de contaminação e subcultivo em LJ com o intuito de expandir a micobactéria para identificação bioquímica.

### **Identificação Bioquímica**

As amostras que apresentaram crescimento em LJ a partir da cultura ou do subcultivo proveniente do MGIT positivo foram encaminhadas para identificação bioquímica do complexo *M. tuberculosis* (detecção da produção de niacina, redução do nitrato e termo-inativação da catalase) [9]. Neste estudo, foram identificadas como complexo *M. tuberculosis* as culturas que produziram niacina, reduziram o

nitrito a nitrito, e tiveram suas catalases inativadas a 68°C. Resultados diferentes dos citados anteriormente foram analisados e considerados como MOTT (*Mycobacteria Other Than Tuberculosis*).

## **MTD**

Parte do sedimento obtido na descontaminação da amostra foi encaminhada para a execução e interpretação do MTD conforme descrito pelo fabricante [11]. O resultado positivo foi interpretado como presença de M.tb e o negativo como ausência M.tb na amostra.

## **Intervalo de realização dos testes e experiência da equipe**

A baciloscopia foi realizada no mesmo dia do recebimento do espécime clínico no laboratório. Já as culturas foram executadas ao longo de 02 dias (no máximo). O MTD foi realizado semanalmente. As identificações foram obtidas nas mesmas semanas em que as culturas ou subcultivos foram positivos.

Todos os colaboradores que executaram os testes citados são treinados e avaliados periodicamente no cumprimento dos respectivos procedimentos descritos nos Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) do laboratório. Não houve cegamento dos mesmos, já que se tratava da execução de exames de rotina.

A figura 1 mostra as etapas de processamento das amostras do estudo.

## **Plano de análise**

Os desfechos de interesse são os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, acurácia, razão de verossimilhança e seus respectivos intervalos de confiança (95%). Estas medidas foram calculadas utilizando o software “Statistical Package for the Social Science” (SPSS) versão 17.0. e o Winpepi versão 11.15.

Uma análise de sensibilidade foi realizada com a exclusão das amostras que apresentaram crescimento de MOTT e outros microrganismos álcool-ácido resistentes, com o intuito de minimizar o impacto do isolamento de outros microrganismos que não o M.tb causando resultados falso-positivos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas sob o nº 0002.0.009.000-11 e foi desenvolvido segundo as recomendações do STARD [12].

## RESULTADOS

Das 175 amostras elegíveis para o estudo, 57 foram excluídas, pois se tratavam de amostras subseqüentes do mesmo paciente. Portanto, foram avaliadas amostras respiratórias de 118 pacientes, onde 74,4% eram do sexo masculino, 25,6% do sexo feminino e apresentaram idade média de  $36,61 \pm 10,6$  anos. Não houve eventos adversos decorrentes da realização das técnicas realizadas. Todos os procedimentos realizados obtiveram resultados conclusivos. A figura 2 mostra o diagrama de fluxo do estudo.

Das 118 amostras analisadas 14,4% apresentaram baciloscopia positiva. A tabela 1 mostra o resultado das culturas realizadas pelos dois métodos. As identificações bioquímicas obtidas a partir das culturas podem ser observadas na tabela 2. O MTD detectou 37 (31,4%) amostras positivas para M.tb. De acordo com a tabela 3, 21 amostras (20,8%) que apresentaram baciloscopia negativa obtiveram resultado positivo para MTD. Apenas uma amostra com baciloscopia positiva não foi detectada pelo MTD. Na tabela 4 podemos verificar os valores de acurácia para o MTD em amostras com baciloscopia negativa.

Ocorreram nove resultados falso-positivos e cinco falso-negativos na comparação entre o MTD e a as culturas positivas identificadas de LJ; seis resultados falso-positivos e oito falso-negativos na comparação com as culturas positivas identificadas do BACTEC MGIT 960. Após a exclusão das MOTTs e do *Rhodococcus sp.* obtivemos quatro casos falso-negativos e nove resultados falso-positivos na comparação com o LJ; seis resultados falso-positivos e quatro falso-negativos na comparação com o BACTEC MGIT 960. A tabela 5 mostra os valores de acurácia diagnóstica do MTD quando comparado ao LJ e ao BACTEC MGIT 960 respectivamente.

## DISCUSSÃO

A implementação de novas tecnologias para o diagnóstico de TB é um desafio devido ao alto custo, adequação das instalações do laboratório, treinamento técnico e suprimento de kits para a rotina. Apesar de seu alto custo, alguns estudos sugerem que as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, como o MTD, são custos efetivos para o diagnóstico de TB mesmo em países pobres [13,14].

Estudos reportaram sensibilidade variável do MTD dependendo da prevalência de HIV. Entretanto, mostraram competência na identificação em amostras com baciloscopia negativa [15–17]. Neste estudo apenas uma amostra com baciloscopia positiva não foi detectada pelo MTD, possivelmente por conta de inibidores, uma vez que foi isolado M.tb em ambos os métodos de cultura. A baciloscopia não detectou BAAR em aproximadamente 21% das amostras em que o MTD foi positivo. Isto mostra a fragilidade da baciloscopia na detecção de micobactérias na população de soropositivos. Diversos fatores influenciam diretamente o resultado da baciloscopia: (i) a experiência do técnico, (ii) a qualidade da amostra, que necessita apresentar entre 5000 a 10000 bacilos por mililitro para evitar a ocorrência de resultados falso-negativos [18,19] e (iii) condições peculiares como co-infecção pelo HIV [19–21]. Entretanto, a baciloscopia ainda é uma ferramenta importante para países com poucos recursos, já que é o método mais rápido e barato disponível em todos os países.

O MTD é aprovado para uso em amostras respiratórias independente do resultado de baciloscopia. A situação em que se proporciona o maior benefício ao paciente é o uso desta metodologia em amostras com baciloscopia negativa, uma vez que permite o diagnóstico precoce e a introdução do tratamento específico. Em nosso estudo, de acordo com o método de referência empregado, obtivemos sensibilidade e especificidade semelhantes aos encontrados por outros autores em pacientes não exclusivamente HIV [22–26].

Foi observada a ocorrência de resultados falso-positivos no MTD. Tal fato se deve à característica das metodologias utilizadas como referência. O MTD pode detectar bacilos mortos ou inviáveis, ou seja, que não crescem ou o fazem com dificuldade no meio de cultura ou detectar bacilos em menor quantidade pelo fato de ser uma metodologia mais sensível. Obtivemos também resultados falso-negativos

para o MTD na comparação com o LJ e o MGIT devido à recuperação de MOTT e *Rhodococcus sp.*, o que é justificável, já que o MTD não detecta estes microrganismos. Os demais resultados falso-negativos foram obtidos nas mesmas amostras, o que indica a possibilidade da presença de substâncias inibidoras ocasionando resultado negativo no MTD uma vez que não houve verificação da presença destes inibidores em nosso estudo. Nossa análise optou por considerar a presença de MOTT e *Rhodococcus sp.*, microrganismos não detectados pelo MTD, como resultados de cultura positiva. Entretanto, isto se justifica pela tentativa de mimetizar na prática da pesquisa a situação real de rotina neste tipo de serviço, onde o clínico recebe um resultado de cultura positiva sem a identificação do microrganismo. Em serviços onde o teste MTD também está disponível, o resultado negativo pode levantar a suspeita da presença de MOTT ou outro microrganismo álcool-ácido resistente, cuja relevância deve ser avaliada caso a caso, aguardando a identificação de espécie.

Uma característica das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos é que a sensibilidade é geralmente um pouco comprometida em detrimento da especificidade [27]. Outros fatores que contribuem para a diminuição da sensibilidade são amostras pobres, paucibacilares ou negativas (pacientes HIV) e a presença de substâncias inibidoras.

Com o intuito de avaliar o MTD sem a interferência de outros microrganismos que não o *M.tb*, realizou-se outra análise excluindo os MOTTs e o *Rhodococcus sp.* isolados, já que o MTD não os identifica. Esta simulação tem o objetivo de deixar os métodos comparáveis, com as mesmas possibilidades de resultado: negativo ou *M.tb*. Nesta nova análise o MTD apresentou aumento da sensibilidade, VPN (Valor preditivo negativo) e acurácia. Também observamos mudanças nas Razões de verossimilhança (RV).

Em nosso estudo, independente do resultado de baciloscopia das amostras, o MTD apresentou sensibilidade e especificidade comparáveis com dados da literatura. Uma revisão sistemática que incluiu 125 estudos em pacientes não exclusivamente paucibacilares estimou uma sensibilidade de 85% e especificidade de 96,8% para técnicas de amplificação de ácidos nucléicos comerciais [27]. Já um estudo recente comparando MTD e GeneXpert em pacientes não exclusivamente paucibacilares obteve sensibilidade de 96,8% e especificidade de 91,2% para o MTD

[28]. Neste estudo houve uma seleção de pacientes muito estritos (nº de amostras, uso de antibióticos, tempo de tratamento...), propiciando uma condição ideal para as comparações, diferente do nosso estudo, em que os pacientes foram selecionados apenas por serem soropositivos para o HIV.

O presente estudo mostrou que o MTD foi capaz de detectar um maior número de amostras positivas para *M.tb* do que as culturas na população TB-HIV positiva. Entretanto, a cultura não é 100% sensível, podendo apresentar resultados negativos, como por exemplo, em casos de bacilos mortos, bacilos inviabilizados pela descontaminação da amostra, ou quantidade inferior ao mínimo para detecção pela cultura (aproximadamente na ordem de  $10^2$  bacilos/mL). Portanto, o resultado do estudo pode ter sido influenciado pelo teste de referência escolhido. A falta de uma técnica padrão de diagnóstico é um dos maiores obstáculos para a avaliação de diagnósticos moleculares, principalmente para pacientes HIV positivo e crianças, que são conhecidos por fornecerem amostras pobres e paucibacilares. A verdadeira acurácia de um teste de amplificação de ácidos nucleicos pode ser maior do que o reportado quando utilizado um padrão de referência imperfeito [29].

Este estudo realiza comparações simultâneas dos resultados das técnicas propostas, e tem como vantagem a realização dos testes de referência nas mesmas amostras. Entretanto como não houve cegamento é difícil avaliar os resultados de cada teste isoladamente. Como se trata de um estudo realizado em condições de rotina, não houve necessidade de coletas adicionais para realização de todos os testes.

A maior vantagem da implementação de uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos na rotina laboratorial é a velocidade em que se obtém o resultado, possibilitando rápida intervenção quando necessário. Entretanto não devem substituir a cultura, já que são capazes de detectar o microrganismo não viável fornecendo resultado falso positivo comparados com as culturas. Pela mesma razão também não são úteis para monitoramento do tratamento uma vez que o resultado não é quantitativo, devem ser interpretados em conjunto com os testes convencionais e dados clínicos. No entanto, são úteis na distinção entre *M. tuberculosis* e MOTT, tornando-se uma ferramenta importante em populações que possuam alta colonização/doença por MOTT, como é o caso dos pacientes HIV positivo. Em conclusão, o MTD na população de TB-HIV positivo se mostrou

sensível, específico, possibilitou o tratamento precoce em muitos pacientes e permitiu a exclusão do diagnóstico de TB, o que nem sempre é possível de forma rápida.

## TABELAS

**Tabela 1 - Resultados das culturas em BACTEC MGIT 960TB e LJ**

	<b>LJ</b> <b>N=118 (%)</b>	<b>BACTEC MGIT 960</b> <b>N=118 (%)</b>
Negativo	85 (72,1)	79 (66,9)
Positivo	33 (27,9)	39 (33,1)

LJ-Lowenstein Jensen.

**Tabela 2 - Resultados das identificações bioquímica das culturas em LJ e BACTEC MGIT 960**

	<b>LJ</b> <b>N=118 (%)</b>	<b>BACTEC MGIT 960</b> <b>N=118 (%)</b>
MOTT	1 (0,8)	3 (2,5)
<i>Rhodococcus sp.</i>	0 (0)	1 (0,8)
M.tb	32 (27,1)	35 (29,7)
Não se aplica	85 (72,1)	79 (66,9)

**Não se aplica:** Amostras que obtiveram cultura negativa não são aplicáveis para identificação bioquímica.

**M.tb:** complexo *M. tuberculosis*

**MOTT:** *Mycobacterium Other Than Tuberculosis*

Tabela 3 - Comparação entre os resultados dicotomizados da Baciloscopia e os resultados do MTD

MTD	Baciloscopia		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	16	21	37
Negativo	1	80	81
Total	17	101	118

MTD – *Amplified Mycobacterium Direct test*.

Tabela 4 - Acurácia do MTD em amostras com baciloscopia negativa

	MTD vs LJ % (I.C.95%)	MTD vs BACTEC MGIT 960 % (I.C.95%)
Sensibilidade	77,8% (52,4 - 93,6)	70,8% (48,6 - 87,3)
Especificidade	91,6% (83,4 - 96,5)	94,8% (87,2 - 98,6)
Valor preditivo positivo	66,7% (43,0 - 85,4)	81,0% (58,1 - 94,6)
Valor preditivo negativo	95,0% (87,7 - 98,6)	91,3% (82,8 - 96,4)

LJ- Lowenstein Jensen; MTD- *Amplified Mycobacterium Direct test*;



Tabela 5 - Acurácia do MTD em amostras respiratórias

	LJ		BACTEC MGIT 960	
	MTD vs LJ % (I.C.95%)	MTD vs LJ sem MOTT % (I.C.95%)	MTD vs BACTEC MGIT 960 % (I.C.95%)	MTD vs BACTEC MGIT 960 sem MOTT e <i>Rhodococcus</i> <i>sp.</i> % (I.C.95%)
Sensibilidade	84,8% (68,1 - 94,9)	87,5% (71,0 - 96,5)	79,5% (63,5- 90,7)	88,6% (73,3 - 96,8)
Especificidade	89,4% (80,8 - 95,0)	89,4% (80,8 - 95,0)	92,4% (84,2 - 97,2)	92,4% (84,2 - 97,2)
Valor preditivo positivo	75,7% (58,8 - 88,2)	75,7% (58,8 - 88,2)	83,8% (68,0 - 93,8)	83,8% (68,0 - 93,8)
Valor preditivo negativo	93,8% (86,2 - 98,0)	95% (87,7 - 98,6)	90,1% (81,5 - 95,6)	94,8% (87,2 - 98,6)
Razão de verossimilhança positiva	8,0 (4,25 - 15,11)	8,25 (4,39 - 15,54)	10,5 (4,77 - 22,96)	11,66 (5,35 - 25,40)
Razão de verossimilhança negativa	0,17 (0,08 - 0,38)	0,14 (0,06 - 0,35)	0,22 (0,12 - 0,41)	0,12 (0,05 - 0,31)
Acurácia	88,1% (80,9 - 93,4)	88,9% (81,7 - 93,9)	88,1% (80,9 - 93,4)	91,2% (84,5 - 95,7)

LJ- Lowenstein Jensen; MTD- Amplified *Mycobacterium* Direct test;

## FIGURAS

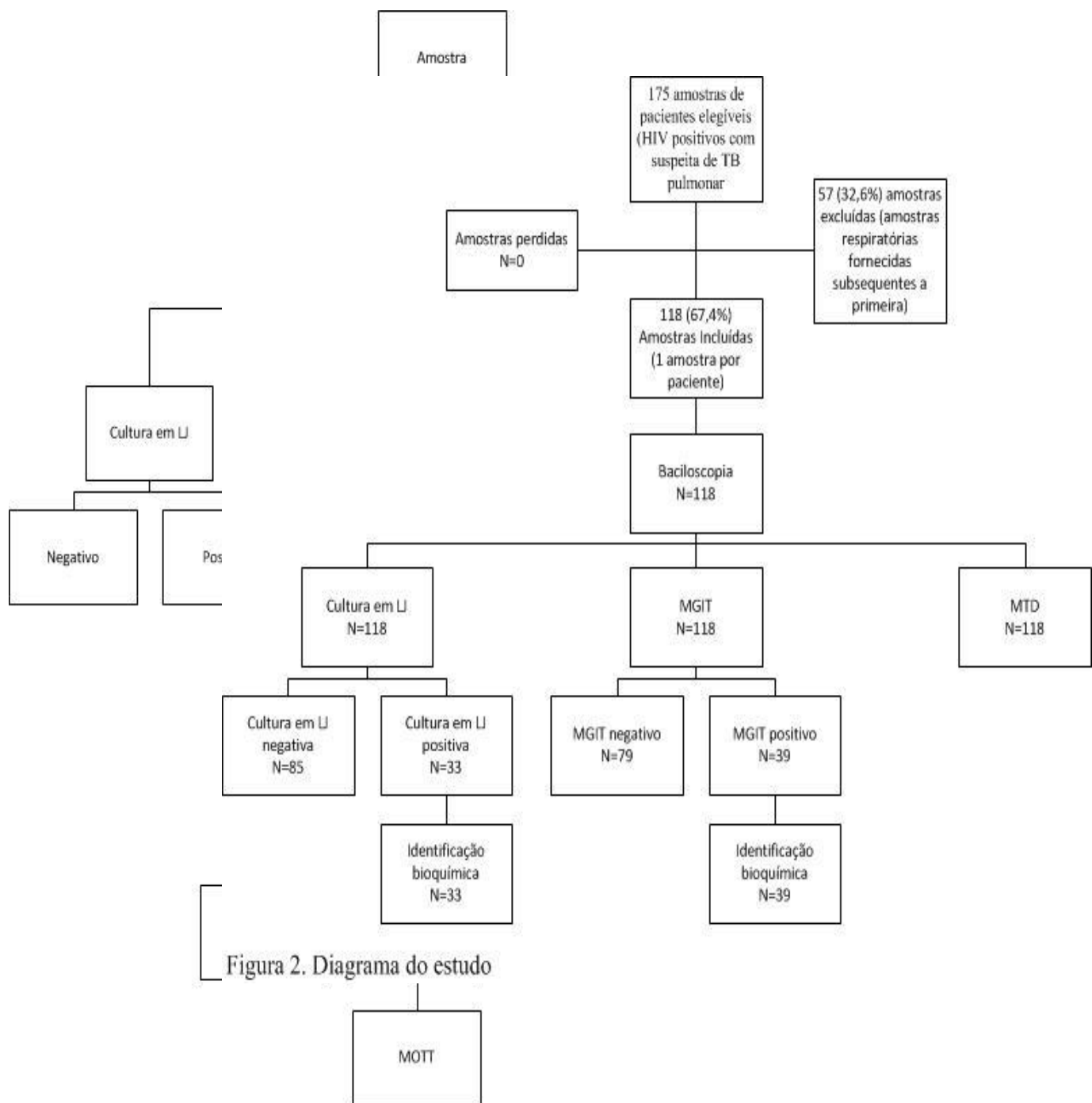


Figura 1. Fluxo de processamento das amostras

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Global tuberculosis control report 2010. 2010;(World Health Organization).
2. WHO. Fact Sheet n°104 [Internet]. 2004;Available from: [http://www.who.int/health\\_topics/tb.htm](http://www.who.int/health_topics/tb.htm)>2004
3. Whalen CC, Nsubuga P, Okwera A, Johnson JL, Hom DL, Michael NL, et al. Impact of pulmonary tuberculosis on survival of HIV-infected adults: a prospective epidemiologic study in Uganda. *AIDS (London, England)*. 2000;14(9):1219.
4. Whalen C, Horsburgh Jr CR, Hom D, Lahart C, Simberkoff M, Ellner J. Site of disease and opportunistic infection predict survival in HIV-associated tuberculosis. *Aids*. 1997;11(4):455.
5. Whalen C, Horsburgh CR, Hom D, Lahart C, Simberkoff M, Ellner J. Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;151(1):129.
6. Whalen C, Okwera A, Johnson J, Vjecha M, Hom D, Wallis R, et al. Predictors of survival in human immunodeficiency virus-infected patients with pulmonary tuberculosis. The Makerere University-Case Western Reserve University Research Collaboration. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(6):1977.
7. Conde MB, Melo FAF, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin PTR, et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia; III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis. *J. bras. pneumol*. 2009;35(10):1018–48.
8. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2009;22(2):174.
9. Kent PT, Kubica GP, (US) C for DC. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control; 1985.
10. Beckton Dickinson. Manual BACTEC MGIT 960. 1998;

11. Gen-Probe Incorporated. Teste Amplified para a detecção directa das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (bioMérieux ref. 39006/Gen-Probe Cat. No. 1001F). 2007;
12. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clinical Chemistry*. 2003;49(1):7.
13. Van Cleeff M, Kivihya-Ndugga L, Githui W, Ng'ang'a L, Kibuga D, Odhiambo J, et al. Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* [Internet]. 2005;9(8):877–83. Available from: [http://docstore.ingenta.com/cgi-bin/ds\\_deliver/1/u/d/ISIS/64919485.1/iatld/ijtld/2005/00000009/00000008/art00010/5AC5E2C7D5B1DF93131858525927CD921C0EA94E8D.pdf?link=http://www.ingentaconnect.com/error/delivery&format=pdf](http://docstore.ingenta.com/cgi-bin/ds_deliver/1/u/d/ISIS/64919485.1/iatld/ijtld/2005/00000009/00000008/art00010/5AC5E2C7D5B1DF93131858525927CD921C0EA94E8D.pdf?link=http://www.ingentaconnect.com/error/delivery&format=pdf)
14. Dowdy D, O'Brien M, Bishai D. Cost-effectiveness of novel diagnostic tools for the diagnosis of tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2008;12(9):1021–9.
15. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(11):1005–15.
16. Kambashi B, Mbulo G, McNERney R, Tembwe R, Kambashi A, Tihon V, et al. Utility of nucleic acid amplification techniques for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in sub-Saharan Africa. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2001;5(4):364–9.
17. Kivihya-Ndugga L, Van Cleeff M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, et al. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(3):1012.
18. Ferreira AAA, Queiroz KCS, Torres KP, Ferreira MÂF, Accioly H, Alves MSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar ea baciloscopia: uma contribuição ao

diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2005;8(2):142–9.

19. Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias [Internet]. 2008; Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_laboratorio\\_tb\\_3\\_9\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb_3_9_10.pdf)

20. Rie AV, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W. Xpert MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2010;10(7):937–46.

21. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil [Internet]. 2010; Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_de\\_recomendacoes\\_controle\\_tb\\_novo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf)

22. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2009;56(2):103–11.

23. Lemaître N, Armand S, Vachée A, Capilliez O, Dumoulin C, Courcol RJ. Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(9):4307.

24. Coll P, Garrigo M, Moreno C, Marti N. Routine use of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct (MTD) test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with smear-positive and smear-negative specimens. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2003;7(9):886–91.

25. O'Sullivan CE, Miller DR, Schneider PS, Roberts GD. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test by using respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(5):1723.

26. Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, Manterola JM, Lonca J, Cardona PJ, et al. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified

Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(3):684.

27. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One*. 2008;3(2):e1536.

28. Teo J, Jureen R, Chiang D, Chan D, Lin R. Comparison of two nucleic acid amplification assays, the Xpert MTB/RIF and the Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) assay, for the detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;;JCM-00211.

29. Walter S, Irwig L, Glasziou P. Meta-analysis of diagnostic tests with imperfect reference standards. *Journal of clinical epidemiology*. 1999;52(10):943–51.

## **CONCLUSÃO**

Em conclusão, o MTD na população de TB-HIV positivo se mostrou sensível, específico, possibilitou o tratamento precoce em muitos pacientes e permitiu a exclusão do diagnóstico de TB, o que nem sempre é possível de forma rápida.

As medidas de acurácia foram obtidas em comparação aos métodos de referência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD JR, L. J.; HAMMOND, P. W.; WIESE, W.; NELSON, N. C. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. **Clinical chemistry**, v. 35, n. 8, p. 1588, 1989.

BECKTON DICKINSON. **Manual BACTEC MGIT 960**. . [S.l: s.n.]. , 1998

BONNET, M.; PINOGES, L. L. P.; VARAINE, F. F. V. *et al.* Tuberculosis after HAART initiation in HIV-positive patients from five countries with a high tuberculosis burden. **Aids**, v. 20, n. 9, p. 1275, 2006.

BOSSUYT, P. M.; REITSMA, J. B.; BRUNS, D. E. *et al.* The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 7, 2003.

CASTELO FILHO, A.; KRITSKI, A. L.; BARRETO, Â. W. *et al.* II Consenso Brasileiro de Tuberculose: diretrizes brasileiras para tuberculose 2004. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. S57–S86, 2004.

CDC. Nucleic Acid Amplification Tests for Tuberculosis. v. 45, 1996.

CDC. Update: Nucleic Acid Amplification Tests for Tuberculosis. v. 49, 2000.

CDC. Updated Guidelines for the Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis. v. 58, p. 7-10, 2009.

CONDE, M. B.; MELO, F. A. F.; MARQUES, A. M. C. *et al.* III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia; III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis. **J. bras. pneumol**, v. 35, n. 10, p. 1018–1048, 2009.

CORBETT, E. L.; WATT, C. J.; WALKER, N. *et al.* The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Archives of internal medicine**, v. 163, n. 9, p. 1009, 2003.

GEN-PROBE INCORPORATED. **Teste Amplified para a detecção directa das micobactérias do complexo Mycobacterium tuberculosis (bioMérieux ref. 39006/Gen-Probe Cat. No. 1001F)**. . [S.l: s.n.]. , 2007



GRECO, S.; GIRARDI, E.; NAVARRA, A.; SALTINI, C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Thorax**, v. 61, n. 9, p. 783, 2006.

HAVLIR, D. V.; BARNES, P. F. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. **New England journal of medicine**, v. 340, n. 5, p. 367–373, 1999.

KEELER, E.; PERKINS, M. D.; SMALL, P. *et al.* Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. **Nature**, v. 444, p. 49–57, 2006.

KRITSKI, A. L.; LAPA E SILVA, J. R.; CONDE, M. B. Tuberculosis and HIV: renewed challenge. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 417–422, 1998.

KRITSKI, A.; CONDE, M.; SOUZA, G. *et al.* Exames complementares utilizados no diagnóstico da tuberculose. **Tuberculose: Do ambulatório à enfermaria. 1ª ed. São Paulo: Ed. Ateneu**, p. 54, 2000.

LING, D. I.; FLORES, L. L.; RILEY, L. W.; PAI, M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e1536, 2008.

MELLO, F.; FONSECA-COSTA, J.; FÁVERO AL, O. M. M. *et al.* Evaluation of an amplification test-AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis (MTB test-Roche Molecular Systems-for the diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis (SNPT) at a teaching hospital, in Rio de Janeiro, Brasil. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, p. A628, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_laboratorio\\_tb\\_3\\_9\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb_3_9_10.pdf)>. , 2008

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico AIDS DST (Versão Preliminar)**. [S.l:s.n.]. Disponível em: <[http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/50652/vers\\_o\\_preliminar\\_69324.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/50652/vers_o_preliminar_69324.pdf)>. Acesso em: 30 nov. 2011a. , 2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Apresentação do Boletim Epidemiológico AIDS/DST 2011.** . [S.I.]: Ministério da Saúde. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2011/Nov/28/COLETIVA\\_AIDS\\_FINAL\\_28.11.11.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2011/Nov/28/COLETIVA_AIDS_FINAL_28.11.11.pdf)>. Acesso em: 30 nov. 2011b. , 2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **24 de Março - Dia Mundial de Luta contra a Tuberculose.** Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31110](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31110)>. Acesso em: 30 nov. 2011c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil.** [S.I: s.n.]. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_de\\_recomendacoes\\_controle\\_tb\\_novo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf)>. , 2010

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. e63, 2000.

NYENDAK, M. R.; LEWINSOHN, D. A.; LEWINSOHN, D. M. New diagnostic methods for tuberculosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 174, 2009.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; DEMAREST, J. F. *et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. **Nature**, v. 362, n. 6418, p. 355–358, 1993.

SARMIENTO, O. L.; WEIGLE, K. A.; ALEXANDER, J.; WEBER, D. J.; MILLER, W. C. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3233, 2003.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. **Boletim Epidemiológico TB MRJ 2001-2006.** . [S.I.]: Prefeitura da Rio de Janeiro. Disponível em: <[http://200.141.78.79/dlstatic/10112/123737/DLFE-1745.pdf/TB\\_BoletimEpidemiologicoTBMRJ2001\\_2006.pdf](http://200.141.78.79/dlstatic/10112/123737/DLFE-1745.pdf/TB_BoletimEpidemiologicoTBMRJ2001_2006.pdf)>. , 2008

STARD. **Site STAndards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies.** Disponível em: <<http://www.stard-statement.org/>>. Acesso em: 11 out. 2011.

TIEMERSMA, E. W.; WERF, M. J. VAN DER; BORGDORFF, M. W.; WILLIAMS, B. G.; NAGELKERKE, N. J. D. Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: A systematic review. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e17601, 2011.

UNAIDS. **Global Report. UNAIDS Report On The Global AIDS Epidemic 2010.** . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123\\_GlobalReport\\_full\\_en.pdf](http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf)>. Acesso em: 29 nov. 2011. , 2010

UNAIDS. **UNAIDS World AIDS Day Report 2011.** . [S.l.]: UNAIDS. Disponível em: <[http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/JC2216\\_WorldAIDSday\\_report\\_2011\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/JC2216_WorldAIDSday_report_2011_en.pdf)>. Acesso em: 30 nov. 2011. , 2011

WAHL, S. M.; GREENWELL-WILD, T.; PENG, G.; HALE-DONZE, H.; ORENSTEIN, J. M. Co-infection with opportunistic pathogens promotes human immunodeficiency virus type 1 infection in macrophages. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. Supplement 3, p. S457, 1999.

WHALEN, C. C.; NSUBUGA, P.; OKWERA, A. *et al.* Impact of pulmonary tuberculosis on survival of HIV-infected adults: a prospective epidemiologic study in Uganda. **AIDS (London, England)**, v. 14, n. 9, p. 1219, 2000.

WHALEN, C.; HORSBURGH JR, C. R.; HOM, D. *et al.* Site of disease and opportunistic infection predict survival in HIV-associated tuberculosis. **Aids**, v. 11, n. 4, p. 455, 1997.

WHALEN, C.; HORSBURGH, C. R.; HOM, D. *et al.* Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 151, n. 1, p. 129, 1995.

WHALEN, C.; OKWERA, A.; JOHNSON, J. *et al.* Predictors of survival in human immunodeficiency virus-infected patients with pulmonary tuberculosis. The Makerere University-Case Western Reserve University Research Collaboration. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 153, n. 6, p. 1977, 1996.

WHO. **Fact Sheet nº104.** . [S.l.: s.n.]. Disponível em:  
<[http://www.who.int/health\\_topics/tb.htm](http://www.who.int/health_topics/tb.htm)>2004>. , 2004

WHO. Global tuberculosis control report 2010. n. World Health Organization, 2010.

WHO. **World Health Organization: HIV/TB Facts 2011.** . [S.l.]: World Health Organization. Disponível em:  
<[http://www.who.int/hiv/topics/tb/hiv\\_tb\\_factsheet\\_june\\_2011.pdf](http://www.who.int/hiv/topics/tb/hiv_tb_factsheet_june_2011.pdf)>. Acesso em: 30 nov. 2011a. , 2011

WHO (ED.). **WHO Report: Global Tuberculosis Control 2011.** . [S.l.]: World Health Organization. Disponível em:  
<[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/gtbr11\\_full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf)>. , 2011b

## ANEXOS

### ANEXO I - TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

#### TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, \_\_\_\_\_,  
colaborador/pesquisador do projeto de pesquisa intitulado “COMPARAÇÃO DO TESTE AMPLIFIED MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DIRECT COM MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM ESPÉCIMES RESPIRATÓRIOS DE PACIENTES HIV POSITIVO”, comprometo manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro,

---