



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ LUIZ DE OLIVEIRA MAGALHÃES

**MODIFICAÇÕES NA BACILOSCOPIA CONVENCIONAL POR ADIÇÃO DE
TRATAMENTO QUÍMICO E SEDIMENTAÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DA
TUBERCULOSE PULMONAR**

Recife
2017

JOSÉ LUIZ DE OLIVEIRA MAGALHÃES

**MODIFICAÇÕES NA BACILOSCOPIA CONVENCIONAL POR ADIÇÃO DE
TRATAMENTO QUÍMICO E SEDIMENTAÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DA
TUBERCULOSE PULMONAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Alzira Maria Paiva de Almeida

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª Nilma Cintra Leal

Recife

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Magalhães, José Luiz de Oliveira

Modificações na baciloscopia convencional por adição de tratamento químico e sedimentação para o diagnóstico da tuberculose pulmonar / José Luiz de Oliveira Magalhães. – Recife, 2017.

141 f. : il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alzira Maria Paiva de Almeida.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2017. Inclui referências e anexos.

1. Tuberculose. 2. Pulmões – Doenças. I. Almeida, Alzira Maria Paiva de (Orientadora). II. Título.

616.995

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 107

JOSÉ LUIZ DE OLIVEIRA MAGALHÃES

**MODIFICAÇÕES NA BACILOSCOPIA CONVENCIONAL POR ADIÇÃO DE
TRATAMENTO QUÍMICO E SEDIMENTAÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DA
TUBERCULOSE PULMONAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 12/12/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida (Orientadora)
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

Profa. Dra. Marise Sobreira da Silva (Examinadora externa)
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

Profa. Dra. Zulma Maria de Medeiros (Examinadora externa)
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

Profa. Dra. Ana Maria Aguiar Santos (Examinadora externa)
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

Prof. Dr. Christian Robson de Souza Reis (Examinador externo)
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ser meu refúgio, fortaleza e socorro bem presente na tribulação. A Ele toda honra e toda glória para sempre.

A meus pais Antônio e Quitéria (in memoriam) e a meus irmãos (Pureza, Tatá, Paulo, Cida, Penha, Zélia, Célia e Oliveira) por terem forjado meu caráter para o bem e por tudo que fizeram por mim.

A minhas filhas pelo amor incondicional e por existirem na minha vida.

A minha companheira Goreth pelo apoio, paciência e compreensão ao longo desses anos.

As minhas orientadoras Dr^a Alzira Almeida e Dr^a Nilma Leal pela oportunidade, pelas orientações, estímulo, tolerância e paciência para superação das dificuldades enfrentadas.

As Dras Fátima Militão, Cinthia Braga e Haiana Scharifker pelas contribuições na elaboração inicial do projeto.

Aos Drs. Ana Albertina, Verônica Matos e Leonardo Oliveira por colaborarem para a consolidação desse trabalho.

A equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia especialmente a Juliana Figueiredo e Ilyana Coutinho, pelo apoio.

A equipe do Serviço de Gestão do Trabalho (Ana Célia, Nilda, Heleny e Luciana) e a Fernanda Pimentel, pelo apoio e solidariedade.

As Dras Janaina Miranda, Cássia Docena, Elza Menezes e Adenilda Eugênia (Secretária de pós-graduação do CCB-UFPE) pelo apoio e amizade.

Aos Drs Zulma Medeiros, Marise Sobreira, Christian Reis, Ana Aguiar e Mégine Cabral pela amizade e ricas contribuições para a melhoria desse trabalho.

Aos profissionais do Setor de Lavagem e Esterilização do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz-PE (Edson, Nelson e Rita) pela disponibilidade e boa vontade em ajudar nas demandas que envolviam aquele setor.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se o desempenho da baciloscopia em escarro processado (BEP) por tratamento com hipoclorito de sódio (NaOCl) e sedimentação espontânea em amostras biológicas de sintomáticos respiratórios provenientes de Unidades de Saúde da cidade do Recife (PE, Brasil) obtidas de julho de 2015 a março de 2016. Comparando a detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em 1.719 amostras, 283 (16,5%) foram positivas pela BD, 368 (21,4%) pela BEP e 1.351 negativas nos dois procedimentos. 85 amostras negativas por BD foram positivas pela BEP equivalente a 30% de aumento na positividade. Quanto à contagem de BAAR os resultados foram concordantes em 148 amostras e em 212 o número de BAAR encontrados pela BEP foi até 10 vezes maior do que na BD. Nas amostras paucibacilares a BEP aumentou a detecção de BAAR em relação à BD. Em 1.346 amostras, 235 (18,0%) foram positivas por cultura, 171 (13%) pela BD, 191 (16%) pela BEP e 234 (18%) pelo Xpert. Das 235 amostras positivas por cultura (verdadeiros positivos) apenas 81% foram positivas pela BEP. Em contrapartida, 22 amostras negativas na cultura foram positivas pela BEP totalizando 213 amostras e elevando a positividade para 16%. Resultados divergentes por cultura e BEP ocorreram principalmente nas amostras paucibacilares, e naquelas com escores maiores de BAAR a concordância foi de 100%. A cultura revelou melhor desempenho, mas a BEP proporcionou considerável aumento da positividade comparada com a BD. Nas comparações houve tanto amostras negativas no Xpert e positivas na BEP quanto o contrário. Nas análises em 436 amostras obtidas de unidades prisionais da cidade de Recife o Xpert foi positivo em 18,6% (81) das amostras, a cultura em 16,3% (71) a BD em apenas 12,6% (55) e a BEP em 16,3% (71). Em relação às 71 culturas positivas a BD identificou BAAR em 50 amostras e a BEP em 67, o que corresponde a 94% de sensibilidade e incremento de 29% na positividade. Em conclusão, além da capacidade de detectar mais casos positivos, a BEP diminui os riscos de contaminação aérea pelos profissionais de laboratório pela inativação dos microrganismos presentes nas amostras.

Palavras chave: Tuberculose pulmonar. Escarro. Baciloscopia. Hipoclorito de Sódio.

ABSTRACT

In this work, the performance of the microscopy in sputum samples processed after treatment with sodium hypochlorite (NaOCl) and spontaneous sedimentation (PSS) was evaluated in patients with signs and symptoms of PTB from Health Units of the city of Recife (PE, Brazil) obtained from July 2015 to March 2016. Out of 1,719 samples, 283 (16.5%) were positive by DS, 368 (21.4%) by PSS and 1,351 negative by both procedures. 85 negative samples by DS were positive by PSS equivalent to a 30% increase in positivity. Regarding the acid-fast bacilli (AFB) counts, there was agreement in 148 samples and in 212 the number of AFB found by PSS was up to 10 times greater than in the DS. Among the paucibacillary samples PSS revealed superior than DS for the AFB detection. In 1,346 samples, 235 (18.0%) were positive by culture, 171 (13%) by DS, 191 (16%) by PSS and 234 (18%) by Xpert. Of the 235 culture positive samples (true positives) only 81% were positive by PSS. Conversely, 22 culture negative samples were positive by PSS totaling 213 samples and raising the positivity to 16%. Disagreement among the culture and PSS results occurred mainly in the paucibacillary samples, and in those with higher AFB scores the agreement was 100%. The culture showed better performance, but PSS brought a considerable increase in positivity compared to DS. In the comparisons there were both Xpert negative samples that were PSS positives and the contrary. In the analysis of 436 samples obtained from prison units in the city of Recife, Xpert was positive in 18.6% (81) of them, culture in 16.3% (71) DS in 12.6% (55) only, and the PSS in 16.3% (71). Regarding the 71 positive cultures, DS identified AFB in 50 samples and PSS in 67, corresponding to 94% sensitivity and 29% increase in positivity. In conclusion, besides the higher ability to detect more positive cases, PSS decreases the risks of aerial contamination in laboratory professionals due to the inactivation of the microorganisms present in the clinical samples.

Key word: Pulmonary Tuberculosis. Sputum. Smear microscopy. Sodium Hypochlorite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Projeção da curva de incidência (A) e de mortalidade (B) necessários para atingir os objetivos estratégicos para o fim da TB 2015-2035	18
Figura 2 -	Três listas de países com alta carga de TB que serão monitorados pela OMS no período de 2015-2020	18
Figura 3 -	Coeficiente de incidência de tuberculose, Brasil, 2007 a 2016	22
Figura 4 -	Coeficiente de mortalidade por tuberculose Brasil, 2005 a 2015	22
Figura 5 -	Micrografia eletrônica do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
Figura 6 -	Aplicação e leitura da Prova Tuberculínica	31
Figura 7 -	Bacilos da Tuberculose corados pelo Método de Ziehl-Neelsen	35
Figura 8 -	Comparação de lâminas positivas para BAAR pela baciloscopia direta (A) e após tratamento da amostra com hipoclorito de sódio (B)	39
Figura 9 -	Crescimento de Mtb em Meios Ogawa-Kudoh e Lowenstein-Jensen	41
Figura 10 -	Fator corda-Coloração de Ziehl-Neelsen	42
Figura 11 -	Equipamento <i>MGIT960</i> (A) e tubos positivos e negativos (B)	45
Figura 12 -	Teste de sensibilidade a antimicrobianos pela técnica de Etest [®]	46
Figura 13 -	Estimativa do número de mortes por HIV/AIDS e TB em 2015 (mostrado em cinza)	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Micobactérias do Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> que podem causar tuberculose em humanos	24
Quadro 2 -	Número de BAAR observados nas baciloscopias, concentrações de bacilos cultiváveis nos escarros e probabilidade de resultados positivos	34
Quadro 3 -	Crítérios da OMS para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia de escarro, após concentração ou não, corada pelo método de Ziehl-Neelsen	36
Quadro 4 -	Interpretação de resultados da pesquisa de BAAR pelos métodos de coloração de Ziehl-Neelsen, Kinyoun e Auramina	37
Quadro 5 -	Crítérios para leitura das culturas em meio sólido (escala semi-quantitativa)	42
Quadro 6 -	Risco de adoecimento por TB dos profissionais de saúde em comparação a população geral	60

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 -	Comparação dos resultados entre métodos: baciloscopia direta, baciloscopia do escarro processado, Xpert e cultura	78
Tabela 2 -	Avaliação quanto ao número de BAAR nas amostras do escarro processado e na cultura	79
Tabela 3 -	Avaliação da acurácia dos resultados das análises das amostras de escarro pelas técnicas, baciloscopia direta, baciloscopia do escarro processado, Xpert e cultura	79

Artigo 2

Tabela 1 -	Analysis of 1,719 sputum samples from individuals with signs and symptoms of PTB by direct smear and processed sputum smears	86
Tabela 2 -	AFB score in 1,719 sputum samples from individuals with signs and symptoms of PTB by direct smear (DS) and processed sputum smears (PSS)	86

Artigo 3

Tabela 1 -	Resultados das análises das amostras de escarro pela baciloscopia do escarro processado, baciloscopia direta convencional, cultura e teste molecular rápido para diagnóstico de tuberculose pulmonar em pessoas privadas de liberdade	96
Tabela 2 -	Avaliação da acurácia das análises das amostras de escarro pela baciloscopia do escarro processado, baciloscopia direta convencional, cultura e teste molecular rápido para diagnóstico de tuberculose pulmonar em pessoas privadas de liberdade	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	antes de Cristo
aDNA	DNA antigo
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BEP	Baciloscopia de escarro processado
CMtb	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
d.C	depois de Cristo
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOTS	Tratamento diretamente observado de curta duração
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
MDR	Multidroga resistente
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MNT	Micobactéria não tuberculosa
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NALC	N-acetil-L-cisteína
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
O-K	Ogawa-Kudoh
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PPD	Derivado proteico purificado
PPL	Pessoas privadas de liberdade
PVHIV	Pessoas vivendo com HIV
TAAN	Teste de Amplificação de Ácido Nucleico
TARV	Tratamento antirretroviral
TB	Tuberculose
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivos Específicos	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 HISTÓRIA DA TUBERCULOSE.....	15
2.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE.....	16
2.3 PRIMEIROS CASOS DE TUBERCULOSE NO BRASIL ATÉ O SÉCULO XX	19
2.4 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA TUBERCULOSE NO BRASIL, EM PERNAMBUCO E EM RECIFE	20
2.5 CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS	23
2.6 MORFOLOGIA DO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	25
2.7 GENOMA DO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	26
2.8 FISIOPATOLOGIA DA TUBERCULOSE	26
2.9 SINTOMAS DA TUBERCULOSE PULMONAR	28
2.10 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR	28
2.10.1 Diagnóstico por critérios clínicos e epidemiológicos	28
2.10.2 Diagnóstico por imagem e broncoscopia	29
2.10.3 Prova tuberculínica ou Reação de Mantoux	30
2.10.4 Diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar	31
2.10.4.1 Baciloscopia direta do escarro	33
2.10.4.2 Baciloscopia por microscopia de fluorescência com Auramina O	36
2.10.4.3 Cultura para micobactérias	39
2.10.4.4 Exame anatomopatológico (histológico e citológico)	44
2.10.4.5 Testes Fenotípicos: detecção de consumo de oxigênio e detecção do fator corda	44
2.10.4.6 MGIT960 (mycobacteria growth indicator tube) e ETEST	45
2.10.4.7 Imunodiagnóstico da tuberculose, testes bioquímicos e ensaios para detecção de interferon gama	46

2.10.4.8 Métodos para detecção direta de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pela amplificação de bacteriófagos	48
2.10.4.9 Testes moleculares	49
2.11 TRATAMENTO DA TUBERCULOSE	52
2.12 RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS	53
2.13 TUBERCULOSE EM POPULAÇÕES VULNERÁVEIS	53
2.13.1 Tuberculose em pessoas vivendo com HIV.....	54
2.13.2 Tuberculose em pessoas privadas de liberdade	56
2.13.3 Tuberculose em pessoas vivendo em situação de rua	58
2.13.4 Tuberculose em populações indígenas do Brasil	58
2.13.5 Tuberculose em profissionais de saúde	59
2.14 ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA PARA MANUSEIO DO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> EM LABORATÓRIO	60
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	62
3.1 ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR.....	63
3.2 ARTIGO 2 - <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> MICROSCOPY DETECTION USING A PROCESSED SPUTUM SMEAR	80
3.3 ARTIGO 3 - ACURÁCIA DA BACILOSCOPIA EM AMOSTRAS DE ESCARRO PROCESSADAS POR TRATAMENTO QUÍMICO E SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM PESSOAS PRIVADAS DE LIBERDADE	87
5 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	100
ANEXO A – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO PARA APRECIÇÃO ÉTICA (CAAE)	116
ANEXO B – APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FIOCRUZ-PE	117
ANEXO C – NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO 1	118
ANEXO D – NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO 3	131
ANEXO E – COMPROVAÇÃO DE ACEITE DO ARTIGO 2	140

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose pulmonar é uma doença infecciosa de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, com altas taxas de morbimortalidade se não for tratada adequadamente.

Apesar da prioridade pelos pulmões, o *Mycobacterium tuberculosis* pode atingir outros órgãos isoladamente (tuberculose extrapulmonar) ou vários órgãos simultaneamente (tuberculose miliar ou disseminada). A tuberculose miliar é a forma mais grave da doença, compromete extensivamente fígado, medula óssea e meninges, sendo mais comum em indivíduos imunocomprometidos. Os sítios mais atingidos são aqueles com maior irrigação sanguínea e oferta de oxigenação como o córtex adrenal e o cerebral, extremidades de crescimento dos ossos longos e vértebras.

A tuberculose pulmonar, além de ser a forma prevalente, também é a mais importante para a saúde pública devido a transmissão aérea do bacilo, prioritariamente em locais fechados, com pouca luz solar e ventilação insuficiente. Essas condições são comuns nos aglomerados urbanos, nas periferias das grandes cidades e nos ambientes onde vivem pessoas em situação de confinamento e privadas de liberdade.

Apesar de ser curável com o uso de antibióticos, a tuberculose apresenta o com maior coeficiente de mortalidade por um só agente infeccioso, principalmente nos países subdesenvolvidos com alta carga da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana.

Entre os testes laboratoriais para o diagnóstico da doença, a baciloscopia direta continua sendo o exame mais empregado mundialmente, mas, é de baixa sensibilidade. Nesse contexto, nas últimas décadas, diversas pesquisas foram desenvolvidas com a finalidade de aumentar a sensibilidade desse método.

No presente estudo, os escarros de pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, após os testes de diagnóstico e liberação dos resultados pelo Laboratório Municipal de Saúde Pública de Recife-PE, foram encaminhados ao Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz-PE, para realização da pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente, pelo método com tratamento químico do escarro e sedimentação espontânea *overnight*. Os resultados desse método foram comparados com a baciloscopia direta convencional, a cultura e o teste molecular rápido Xpert MTB/RIF. A metodologia utilizada no estudo e a análise de acurácia estão apresentadas em forma de três artigos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar modificações na baciloscopia convencional por adição de tratamento químico e sedimentação para o diagnóstico da tuberculose pulmonar

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da tuberculose pulmonar;
- b) Avaliar a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* por microscopia em esfregaço de escarro processado em comparação com a baciloscopia direta convencional;
- c) Avaliar a acurácia da baciloscopia em amostras de escarro processadas por tratamento químico e sedimentação espontânea no diagnóstico da tuberculose pulmonar em pessoas privadas de liberdade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRIA DA TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma das enfermidades infectocontagiosas mais antigas já registradas e seu agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), acompanha e evolui com a humanidade desde os primórdios (NAVIN; MCNABB; CRAWFORD, 2002). Um dos registros mais antigos da TB já confirmado em humanos ocorreu quando em Atlit-Yam, local agora submerso, localizado no Mediterrâneo Oriental, foram encontrados esqueletos de uma mulher e uma criança de 9.250 e 8.160 a.C., respectivamente, nos quais foi possível detectar o DNA antigo (aDNA) de cepas de Mtb com características consistentes de linhagens genéticas das micobactérias agora existentes (HERSHKOVITZ *et al.*, 2008). Outras ossadas humanas de 8.000 a 5.000 a.C., encontradas em países da Europa (França, Itália, Alemanha, Dinamarca) e Oriente Médio (Jordânia) possuíam evidências de TB na coluna vertebral. Lesões características de TB também foram identificadas em 44 múmias egípcias bem preservadas, datadas de 3.700 a 1.000 a.C. Descrições de sintomas de uma patologia semelhante à TB, de aproximadamente 2.000 a.C, foram deixadas pelos povos orientais, hindus e chineses (CONDE *et al.*, 2002; ROSEMBERG, 1999).

Em 380 a.C., Hipócrates, o pai da medicina, observando as lesões caseosas da TB, denominou a doença de “phthisis” (tísica), que significa “definhar”. Porém, somente, no século II d.C., o médico grego Galeno desenvolveu esquemas terapêuticos para tratamento da doença com recomendações ao paciente para habitar em climas amenos, repousar e ter uma boa alimentação (CONDE *et al.*, 2002). Somente em 1478, houve o aprofundamento do estudo histopatológico da TB e, em 1543 Andreas Versalius, autor da primeira obra sobre anatomia humana, em seus trabalhos de dissecação de cadáveres observou que os indivíduos mortos pela tísica sempre apresentavam lesões pulmonares com características semelhantes (KRITSKI *et al.*, 2000).

Francisco de Layden (anatomista holandês), em 1679, descreveu nódulos endurecidos encontrados nos pulmões dos indivíduos que faleciam por TB, denominando-os de “tubérculos” concluindo que a doença atingia primeiramente os pulmões. Laennec, em 1819, teve o mérito de demonstrar que todas as lesões encontradas nos tísicos, eram manifestações do mesmo mal e Schönlein, em 1839, denominou a doença de “tuberculose” (KRITSKI *et al.*, 2000).

Por fim, no ano de 1882, o médico e bacteriologista alemão Hermann Heinrich Robert Koch provou que a TB era uma infecção causada por um microorganismo denominado por ele de *Bacterium tuberculosis* que depois recebeu o nome de bacilo de Koch (BK) em sua homenagem. Por essa descoberta, Robert Koch ganhou o Prêmio Nobel de Medicina em 1905 e também estimulou os pesquisadores da época a buscarem tratamentos mais eficazes no combate à doença (DUCATI *et al.*, 2006).

Na Alemanha, em 1896, Karl B. Lehmann e Rudolf Otto Neumann observaram semelhança no crescimento do Mtb em meio de cultivo líquido com o crescimento de fungos. Incluíram os bacilos da lepra e da TB no gênero *Mycobacterium* (*fungus bacterium*), também comprovaram a morfologia e propriedades tintoriais de álcool-ácido resistência desses microrganismos (COLLINS *et al.*, 1985).

Quanto a existência do Mtb no continente americano, Salo *et al.* (1994), conseguiram identificar o aDNA do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb) em múmias naturalmente mumificadas, provenientes do sítio arqueológico de Chiribaia Alta no Peru, datadas de 1.000 a 1.300 d.C, respectivamente. Esse evento comprova definitivamente que o Mtb já existia no continente americano antes da colonização.

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

Diante da estimativa de que mundialmente existem 2 a 3 bilhões de pessoas infectadas pelo Mtb, em 1993 a OMS reconheceu a TB como uma emergência global. Visando reduzir o coeficiente de incidência da doença foram propostas políticas internacionais de saúde, também contempladas nos oito Objetivos de Desenvolvimento do Milênio da Organização das Nações Unidas (KRITSKI *et al.*, 2007).

Para atingir a meta de reduzir em 50% os coeficientes de prevalência e de mortalidade por TB em comparação a 1990, a OMS lançou o tratamento diretamente observado de curta duração (estratégia DOTS) do inglês (*Directly Observed Treatment Short Course*). Entre outras medidas recomenda o tratamento supervisionado com o objetivo de detectar maior número de casos de TB e melhorar a adesão do paciente ao tratamento, com impacto direto no aumento das taxas de cura e diminuição da transmissão do bacilo (KRITSKI; FIUZA DE MELLO, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006a).

Os indivíduos com TB pulmonar eliminando bacilos representam a mais importante fonte de transmissão da doença, portanto, identificar e tratar corretamente os doentes, sempre através da estratégia DOTS é imprescindível para o controle da TB (FREIRE *et al.*, 2007). Os

casos devem ser priorizados pelos profissionais de saúde, tendo em vista que, logo após o início do tratamento, os bacilos perdem a capacidade de infectar outros indivíduos com quebra na cadeia de transmissão. O esquema terapêutico, as dosagens e o tempo de uso corretos, acompanhados da ingestão supervisionada dos medicamentos pelo paciente, são imprescindíveis para alcançar êxito no tratamento e evitar o surgimento cepas de *Mtb* resistente às drogas (BRASIL, 2011; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Devem ser priorizadas as ações que garantam assistência diferenciada e realização do tratamento ininterrupto de pacientes em situação de rua, privados de liberdade, institucionalizados em asilos e manicômios, etilistas e casos de retratamento após abandono.

No ano de 2006 a OMS lançou o plano Stop TB Partnership para o controle mundial da doença com a visão de um mundo livre de TB. Esse plano ampliou e aperfeiçoou a estratégia DOTS com a melhoria do diagnóstico bacteriológico pela garantia de uma bacteriologia de qualidade (KRITSKI; FIUZA DE MELLO, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006b) e atualizou com o “End-TB” em 2017 (PETERSEN *et al.*, 2017).

Os investimentos para maior qualidade do diagnóstico e eficiência do tratamento contribuíram para melhoria do panorama da doença em nível mundial, entretanto, a taxa de mortalidade por TB é ainda maior que as taxas de mortalidade por malária e pelo *Vírus da Imunodeficiência Humana* - “*Human Immunodeficiency Virus*” (HIV) juntas, sinalizando para a gravidade da doença em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Em 2014, na Assembleia Mundial de Saúde foi aprovada a nova estratégia global para enfrentamento da TB com projeção de metas que visam acabar a doença, como um problema de saúde pública, até o ano de 2035. Essa estratégia visa “Um Mundo livre de TB” e, pretende alcançar um coeficiente de incidência menor que 10/100.000 habitantes e acabar com os casos de morte por TB conforme apresenta a Figura 1A e Figura 1B respectivamente.

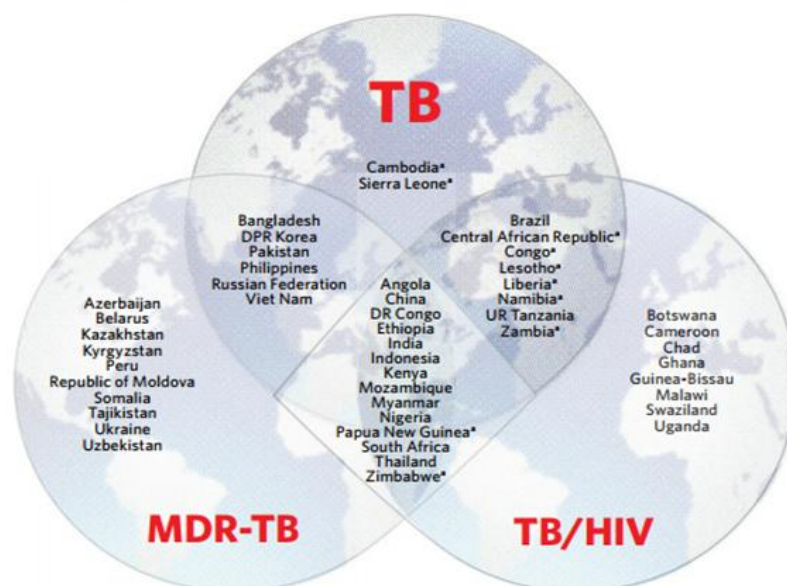
Figura 1 - Projeção da curva de incidência (A) e de mortalidade (B) necessários para atingir os objetivos estratégicos para o fim da TB 2015-2035



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2016)

Também, foram elaboradas três listas de países com alta carga de TB que serão monitorados pela OMS no período de 2015-2020 para trabalhar a incidência de TB, a coinfeção com o HIV e a TB multidroga resistente (MDR) conforme demonstrado na Figura 2. Nessas listas o Brasil configura como um país com alta carga de TB e de coinfeção com o HIV (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Figura 2 - Três listas de países com alta carga de TB para serem monitorados pela OMS no período de 2015-2020



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2016)

Em 2015, a prevalência de TB foi 42% menor que no ano de 1990, entretanto, aconteceram ainda 10,4 milhões de casos novos de TB e mais 1.8 milhão de mortes, dos quais, 0.4 milhão eram pessoas coinfetadas pelo HIV, configurando a TB como a doença infecciosa com maior número de vítimas fatais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Apesar da tendência a declínio nas taxas de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos, nas regiões com alta prevalência de infecção pelo HIV e síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) o número de casos de TB resistente aos medicamentos (MDR-TB) e a taxa de mortalidade estão aumentando. Dessa forma, a doença apesar de existir a milênios e ser curável na maioria dos casos com diagnóstico oportuno e tratamento correto, ainda hoje permanece como uma das 10 maiores causas de morte no mundo, sendo a primeira por um só agente infeccioso (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Contribui para esse quadro as desigualdades sociais e a coinfeção pelo HIV responsáveis pela segregação das populações mais vulneráveis ao adoecimento e morte por TB, a insuficiência de pesquisas visando o desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas, deficiência do sistema de saúde e aumento da prevalência de casos de MDR-TB (BARREIRA; GRANGEIRO, 2007; CAMBANIS *et al.*, 2007; GANDI; ZUMLA, 2004).

2.3 PRIMEIROS CASOS DE TUBERCULOSE NO BRASIL ATÉ O SÉCULO XX

Foi durante a colonização portuguesa que surgiram os primeiros casos de TB no Brasil, quando os jesuítas e colonos infectados pela “peste branca” transmitiam o bacilo de Koch aos nativos, que não possuíam imunidade contra o bacilo e ao contraírem a doença morriam rapidamente, levando muitas tribos indígenas ao extermínio (RIBEIRO, 1971).

O Padre Manuel da Nóbrega é referido como o primeiro portador de TB que chegou ao Brasil no ano de 1549 (CAMPOS; PIANTA, 2001). As cartas de Inácio Loyola em 1555 e de José de Anchieta em 1583 destinadas ao reino de Portugal relatam uma doença cujos sinais clínicos são compatíveis com a TB pulmonar “os índios, ao serem catequisados [catequizados], adoecem, na maior parte, com escarro, tosse e febre, muitos cuspiendo sangue, a maioria morrendo com deserção das aldeias” (ROSEMBERG, 1999, p. 7). A epidemia de TB atingiu a maioria das cidades brasileiras mantendo sempre estreita relação com as precárias condições de moradia, desnutrição e higiene inadequada, ficando conhecida como “a praga dos pobres” (SHEPPARD, 2001).

Durante o século XIX, a saúde pública no Brasil servia aos interesses econômicos e políticos da elite onde as práticas sanitárias eram voltadas para o controle das doenças que pudessem prejudicar a expansão econômica capitalista (ALENCAR *et al.*, 1985; SIQUEIRA-BATISTA, 2007). Como consequência, no final do século XIX e início do século XX, a TB já era considerada como a principal causa de morte no Rio de Janeiro (NASCIMENTO, 2005), assim como mundialmente, onde a taxa de mortalidade era de 50% dos indivíduos acometidos pela doença (HIJJAR; PROCÓPIO, 2006).

A assistência aos tuberculosos, desde o Brasil colônia até meados do século XX, era praticamente dispensado pelas Santas Casas de Misericórdia até que a partir ano de 1920 houve a criação dos sanatórios e dos dispensários (BELCULFINÉ, 2009). No país, a falta de leitos era crítica e no Rio de Janeiro dos anos 20 e 30, os órgãos oficiais criaram abrigos em casarões alugados nos bairros populares para suprir a insuficiência de leitos. Naquele momento, nas estâncias climáticas, devido à superlotação, a situação era muito grave e os governos estaduais, pela Campanha Nacional Contra a TB do Ministério da Saúde e pelas Ligas Assistenciais Contra a TB, optaram pela construção de hospitais para tratar os doentes, amenizando a situação (ROSEMBERG, 1999).

Nesse período, a TB continuou com altas taxas de morbimortalidade, com redução desse quadro a partir de meados do século XX, com o advento dos quimioterápicos (ANTUNES; WALDMAN; MORAES, 2000).

2.4 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA TUBERCULOSE NO BRASIL, EM PERNAMBUCO E EM RECIFE

A TB é mais frequente nos aglomerados urbanos com grande concentração populacional, baixa condição socioeconômica e precárias condições sanitárias. Os grupos mais vulneráveis e que concentram o maior número de casos são as populações indígenas pela situação de pobreza, indivíduos em situação de rua, portadores do vírus HIV/AIDS e as pessoas privadas de liberdade (BRASIL, 2011).

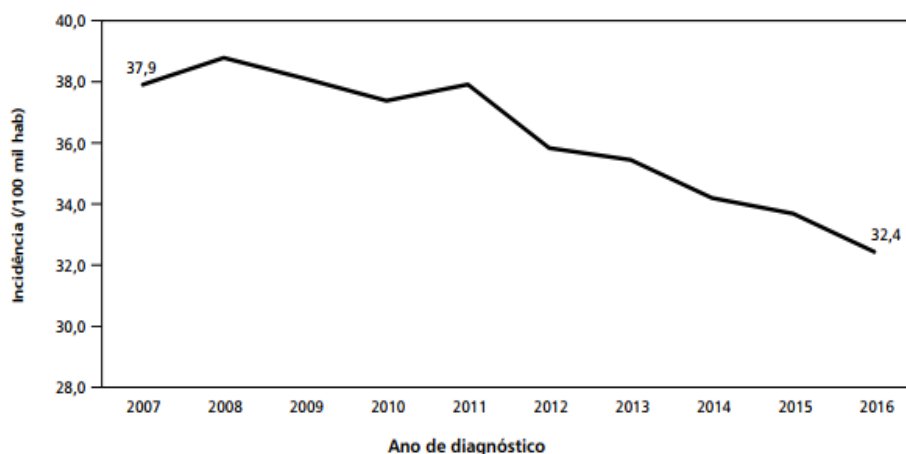
Apesar de ser curável na maioria dos casos e ter o diagnóstico e o tratamento gratuitos, mais de quatro mil indivíduos morrem anualmente por complicações da doença no país (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2015, 2016). Nas Américas, 33% dos casos de TB em 2015 foi no Brasil, sendo a 4ª causa de morte por doença infecciosa em pacientes imunocompetentes e a 1ª nos pacientes com AIDS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

No período de 2005 a 2014 foram diagnosticados 70 mil casos novos de TB com 4.400 mortes por ano e entre 2012-2015, tiveram 840 casos novos de TB com cepas de *Mtb* resistentes a qualquer um dos fármacos utilizados no tratamento da infecção. No período de 2006 a 2015 houve uma redução de 15,4% no coeficiente de mortalidade por TB, passando de 2.6/100 mil hab., para 2.2/100 mil hab. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2015, 2016, 2017).

No período de 2007 a 2016, o coeficiente de incidência da doença apresentou uma variação média anual de menos 1,7%, passando de 37,9/100 mil hab. em 2007 para 32,4/100 mil hab. em 2016 (Figura 3). Apesar dessa redução, convém ressaltar que a meta para eliminação de TB como problema de saúde pública no Brasil é menos 10 casos para cada 100 mil habitantes e para atingir essa meta é necessário melhorar os indicadores epidemiológicos como a redução do coeficiente de incidência de AIDS (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017).

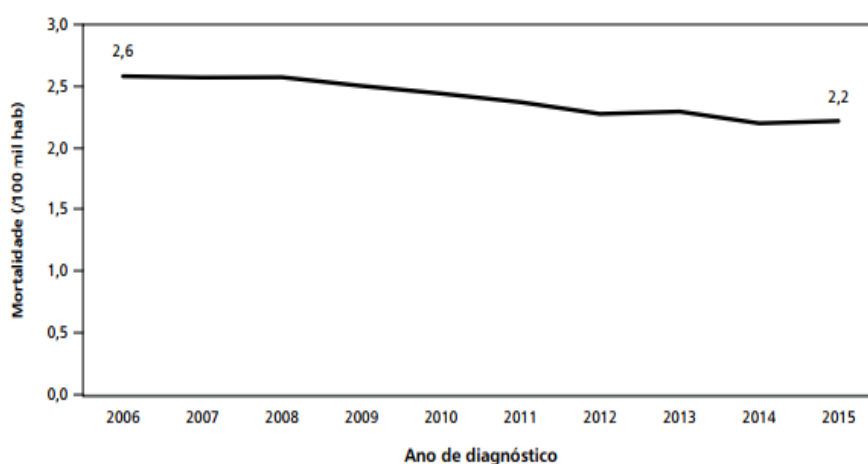
No ano de 2016, foram diagnosticados e registrados 66.796 casos novos e 12.809 casos de retratamento com possibilidade de surgimento de cepas multirresistente. No país, o risco de adoecimento por TB é bastante heterogêneo entre as Unidades da Federação (UF) e em 2016 variou de 10,5/100 mil hab., no Distrito Federal a 67,2/100 mil hab. no Amazonas. Dos estados que apresentaram coeficiente de incidência acima do registrado no país foi Amazonas e Rio de Janeiro com 67,2/100 mil hab., e 61,2/100 mil hab., respectivamente. O estado de Pernambuco tem a terceira maior taxa de incidência com 45/100 mil habitantes. Em 2016, 37% do total de casos novos e 45% dos casos de retratamento registrados no país residiam nas capitais (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017).

As capitais com maior coeficiente de incidência, em ordem decrescente, foram: Manaus (93,2/100 mil hab.), Recife (90,4/100 mil hab.), Rio de Janeiro (84,2/100 mil hab.), Porto Alegre (80,4/100 mil hab.) e Belém (75/100 mil hab.). De forma semelhante à distribuição do risco de adoecimento entre as UF, as capitais apresentam riscos heterogêneos, com coeficientes de incidência variando de 10,5/100 mil hab. em Brasília a 93,2/100 mil habitantes em Manaus (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017).

Figura 3 – Coeficiente de incidência de tuberculose, Brasil, 2007 a 2016

Fonte: Boletim Epidemiológico (2017)

O coeficiente de mortalidade por TB no Brasil teve uma redução de 15,4% no período de 2006 a 2015, passando de 2,6/100 mil hab. para 2,2/100 mil hab. (Figura 4). Apesar dessa redução, em 2015, o Brasil ainda registrou 4.543 óbitos por TB e, também nesse mesmo ano, os estados do Rio de Janeiro (5,0/100 mil hab.), de Pernambuco (4,5/100 mil hab.), do Amazonas (3,2/100 mil hab.) e do Pará (2,6/100 mil hab.) apresentaram os maiores riscos para o óbito por TB. No que se referem às capitais, as que apresentaram os maiores riscos de morte por TB foram Recife/PE (7,7/100 mil hab.), Rio de Janeiro/RJ (6,2/100 mil hab.), Belém/PA (5,1/100 mil hab.) e Salvador/BA (4,0/100 mil hab.) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017).

Figura 4 – Coeficiente de mortalidade por tuberculose Brasil, 2006 a 2015

Fonte: Boletim Epidemiológico (2017)

Em 2016, entre os estados da federação, Pernambuco (PE) ocupou o terceiro lugar em casos novos de tuberculose, com um coeficiente de incidência de TB 45/100 mil habitantes e o coeficiente de mortalidade foi de 4,5/100 mil habitantes e ocupou o 1º lugar em mortes por TB. O percentual de pacientes que abandonaram o tratamento foi de 8,3% e a taxa de cura dos casos novos de TB MDR foi de 72%. Entretanto, em Recife, capital do estado de PE, nesse mesmo ano, o coeficiente de incidência foi 90,4/100 mil habitantes e a taxa de mortalidade manteve o percentual de 7,7/100 mil hab. Essas altas taxas de incidência e mortalidade colocam Recife como segunda do país em número de casos novos e a primeira em número de óbitos. Em PE o percentual de casos novos de TB pulmonar confirmados por critério laboratorial foi 63,1%. Dos casos de retratamento de TB pulmonar apenas 17,3% realizaram a cultura de escarro e das culturas positiva somente em 14,3% foi realizado o teste de sensibilidade às drogas (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017).

2.5 CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

As micobacterias são classificadas como pertencentes ao filo Actinobacteria, ordem dos *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. Anteriormente, apenas as espécies *M. tuberculosis* e o *M. leprae* eram do interesse médico (DORRONSORO; TORROBA, 2007).

O gênero *Mycobacterium* é constituído por mais de 130 espécies sendo a maioria saprófita e outras capazes de causar doenças em humanos e animais. As micobacterias que podem causar TB no homem são as espécies do *Complexo M. tuberculosis* entre as quais, destaca-se o *M. tuberculosis* que está globalmente distribuído e configura-se como o principal responsável pela maioria das infecções em humanos (GAGNEUX, 2012; GOMILA *et al.*, 2008). As outras micobactérias do *Complexo Mycobacterium tuberculosis* estão relacionadas no quadro 1.

Quadro 1 - Micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* que podem causar tuberculose em humanos

Micobactéria	Tuberculose em humanos
<i>M. africanum</i>	Humanos na África (FORRELLAD <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. canetti</i>	Humanos na África (FORRELLAD <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. bovis</i> ,	Bovinos, caprinos (SALES <i>et al.</i> , 2001)
<i>M. microti</i>	Roedores do gênero <i>Microtus</i> e humanos imunocomprometidos (PANTEIX <i>et al.</i> , 2010)
<i>M. pinnipedii</i>	Pinípedes (focas, morsas e leões marinhos) (COUSINS <i>et al.</i> , 2003)
<i>M. caprae</i>	Caprinos na Europa (ARANAZ <i>et al.</i> , 2003)
<i>M. orygis</i>	Mamíferos do gênero <i>oryx</i> , (antílopes) (VAN INGEN <i>et al.</i> , 2012)
<i>M. mungi</i>	Espécie <i>Mungos mungo</i> (família dos suricatas) (ALEXANDER <i>et al.</i> , 2010).
<i>M. bovis</i> BCG	Linhagem não virulenta do <i>M. bovis</i> (DUCATI <i>et al.</i> , 2006; SALES <i>et al.</i> , 2001)

Fonte: o autor (2016)

Outras espécies denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT), do inglês *non tuberculosis mycobacteria*, têm sido isoladas de animais, água de lagos e rios, solo, plantas e outras fontes ambientais. As MNT quando acometem os humanos podem se desenvolver em qualquer tecido ou órgão e disseminar-se pelo organismo, principalmente em imunocomprometidos. Nessas espécies, o alto percentual de lipídeos na parede celular dificulta a entrada de corantes derivados da anilina e, para serem visualizadas ao microscópio, necessitam de coloração especial com arilmetanos e não se descoram pela mistura álcool-ácido (DORRONSORO; TORROBA, 2007).

As MNT, pela velocidade de crescimento em meios de cultura sólidos, são denominadas de espécies de crescimento rápido quando formam colônias visíveis a olho nu em até sete dias e as de crescimento lento quando ultrapassam esse tempo para serem visualizadas (ADÈKAMBI; DRANCOURT, 2004). As MNT de crescimento rápido são pouco virulentas, não apresentam homogeneidade na coloração específica para o gênero *Mycobacterium* e não respondem bem aos fármacos específicos para tratamento da TB. As espécies *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* são frequentemente isoladas nas infecções em humanos, geralmente localizam-se em tecidos subcutâneos profundos por traumas ou pelo uso de cateteres, curativos contaminados, válvula cardíaca, diálise peritoneal ou broncoscopia. Esses microrganismos raramente estão envolvidos em infecções disseminadas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

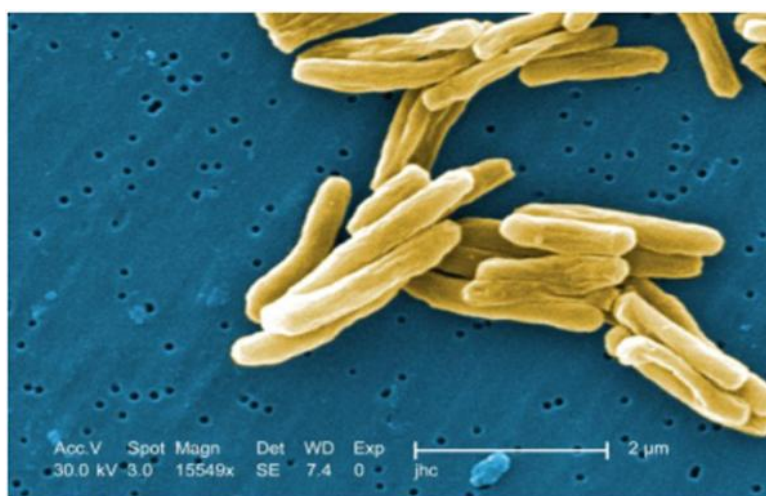
As micobactérias, diferentes das outras bactérias não formadoras de esporos, são mais resistentes a variações de temperatura e umidade, podendo sobreviver a congelamentos e dessecação, mas, são inativadas pela luz ultravioleta e calor acima de 65°C. Quando

protegidas da luz solar resistem semanas ou meses na superfície de objetos inanimados, embora esta não seja uma fonte de infecção considerável (PFYFFER; BROWN-ELLIOTT; WALLAC, 2003).

2.6 MORFOLOGIA DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

O Mtb é um bacilo com 0,2 a 0,7 por 1 a 10 micrômetros e pode ser visualizado ao microscópio na forma cocobacilar ou filamentosa (Figura 5) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006). É um patógeno aeróbio com homogeneidade genética (BLOOM, 1994), Gram positivo fraco, não possuem flagelos, não formam esporos, não possuem cápsulas nem produzem toxinas. A divisão celular (replicação) é lenta, ocorre a cada 18 a 24 horas (DUCATI *et al.*, 2006) e contribui para a natureza crônica da doença com longos regimes de tratamento (COLE *et al.*, 1998).

Figura 5- Micrografia eletrônica do *Mycobacterium tuberculosis*



Fonte: Todar (2012)

O envelope celular é complexo, constituído por um arcabouço de peptideoglicano e ácidos graxos de cadeia longa que formam espessa camada lipídica de ácidos micólicos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006). Essa camada de ácidos micólicos funciona como uma barreira protetora contra desidratação por produtos químicos, além de dificultar a ação de antibióticos e enzimas no interior de macrófagos, retêm os corantes específicos (fucsina e auramina) e resistem à descoloração com uma solução de álcool etílico-ácido clorídrico, daí a denominação do bacilo de álcool-ácido resistente (BAAR). Entre esses, o composto 6-6' dimicolato de trealose está envolvido em mecanismos imunomoduladores

relacionados à virulência, patogenicidade, inibição da fusão de fagossomos e lisossomos no interior dos macrófagos (INDRIGO; HUNTER; ACTOR, 2003).

Além disso, o aspecto dos bacilos em forma de cordas (fator corda), quando observados ao microscópio é utilizado para identificação presuntiva do Mtb, tendo em vista que a maior parte das MNT não apresenta o fator corda (ATTORRI; DUNBAR; CLARRIDGE, 2000; MORRIS; RELLER, 1993). A membrana citoplasmática seleciona e transporta água e nutrientes, realiza a respiração celular, produz energia, sintetiza pigmentos carotenoides e niacina que são utilizados na identificação fenotípica das espécies. Os grânulos de polifosfato fornecem a energia necessária para as atividades celulares e multiplicação dos bacilos. No citoplasma da micobactéria estão os ribossomos contendo o ácido ribonucleico (ARN), responsável pela síntese de proteínas como a enzima nitrato redutase, utilizada para identificação bioquímica do *M. tuberculosis* (CAMPELO *et al.*, 2001).

2.7 GENOMA DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

O genoma completo do *M. tuberculosis* cepa H37Rv foi publicado por Cole e colaboradores em 1998, permitiu o conhecimento de aspectos únicos e característicos do bacilo de Kock (DUCATI *et al.*, 2006; SMITH, 2003). O Mtb tem um cromossoma circular de 4.411.529 pares de bases, com aproximadamente 4.000 genes, um número bem maior que em outras bactérias, codificando enzimas envolvidas na síntese do envelope celular e sobrevivência no hospedeiro e tem 250 enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos. Os ácidos graxos são as maiores fontes de carbono e esse grande número de enzimas envolvidas na degradação desses ácidos podem aumentar a habilidade do Mtb infectar os tecidos do hospedeiro, que é rico em sequências de inserção (IS) de DNA repetitivo em regiões que pode impedir a inativação de genes (SMITH, 2003).

Após o conhecimento da sequência genômica surge uma nova fase na identificação dos aspectos da colonização e sobrevivência nos diversos sítios do organismo humano, na ação dos antimicrobianos no combate à bactéria e principalmente na rapidez do diagnóstico da tuberculose (DUCATI *et al.*, 2006).

2.8 FISIOPATOLOGIA DA TUBERCULOSE

A infecção por *M. tuberculosis* e consequente formação do granuloma, ocorre em várias etapas (GRIFFITHS *et al.*, 2010):

- a) A infecção começa com a inalação dos bacilos presentes nos aerossóis gerados quando o indivíduo com TB pulmonar tosse, fala, espirra ou canta. Essas micropartículas ou núcleo seco de Wells com bacilos viáveis no seu interior se depositam no espaço alveolar do pulmão (WELLS; LURIE, 1941). Os alvéolos pulmonares são estruturas de paredes finas, especializados na troca de gás e neles ocorrem os principais eventos da TB (GRIFFITHS *et al.*, 2010);
- b) Na cavidade alveolar, os principais hospedeiros para os bacilos são macrófagos alveolares. Após a multiplicação bacteriana inicial nesses macrófagos, as bactérias são absorvidas por células dendríticas (DCs), que transportam o Mtb até os linfonodos de drenagem dos nódulos linfáticos torácicos. Alternativamente, DCs da mucosa alveolar podem levar bacilos ao parênquima pulmonar, iniciando o foco inflamatório local (GRIFFITHS *et al.*, 2010);
- c) Nos gânglios linfáticos de drenagem, as DCs carregando bacilos sofrem apoptose e os péptidos antigênicos micobacterianos liberados são apresentados as DCs dos linfonodos onde os linfócitos T ativados se diferenciam em células T naive específicas, através da apresentação cruzada. Na apresentação do antígeno, as células T ativadas proliferam, tornam-se células T efectoras e dependendo do tipo de citocina no meio, ocorre a produção de subconjuntos de células T CD4 + auxiliares polifuncionais, que deixam os linfonodos para alcançar a circulação sanguínea através do duto linfático eferente e do duto torácico (GRIFFITHS *et al.*, 2010);
- d) As células T efectoras originárias dos gânglios linfáticos drenantes, sob a influência de quimiocinas, de outros mediadores e células mononucleares, voltam ao local da inflamação através dos capilares sanguíneos pulmonares e iniciam a formação do granuloma para conter a infecção. Se a infecção for debelada, ocorre o encapsulamento dos bacilos e fica apenas cicatriz que não é visível na radiografia de tórax. Portanto, o granuloma clássico da TB é constituído por um núcleo central de macrófagos infectados rodeados por macrófagos epiteliais e espumosos e uma borda periférica de linfócitos (células B, células T CD4 e células T CD8) em associação com um manguito fibroso da matriz extracelular colocada por fibroblastos (GRIFFITHS *et al.*, 2010).

Diversas situações contribuem para o desenvolvimento da TB, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) faz referência às pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHIV), usuários de drogas (tabagismo e alcoolismo), portadores de doença renal grave, diabetes, silicose, desnutrição (baixo peso corporal), cânceres, transplantados, uso de corticosteroides,

peessoas em tratamento para artrite reumatoide e doença de Crohn (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009). A OMS acrescenta à lista, as pessoas vivendo em situação de rua, indivíduos em situação de confinamento como as pessoas privadas de liberdade (PPL), estudantes e profissionais da saúde (ROTH *et al.*, 2005). Outros fatores importantes são: precárias condições de moradia e renda, escolaridade baixa e idade avançada (KOYANAGI *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2007; VENDRAMI *et al.*, 2005).

2.9 SINTOMAS DA TUBERCULOSE PULMONAR

O sintoma mais frequente é a tosse que inicialmente pode ser seca e posteriormente com expectoração mucoide ou purulenta (DUNLAP *et al.*, 2000). Outros sintomas iniciais relevantes são: febre vespertina moderada, sudorese noturna, inapetência, emagrecimento rápido, irritabilidade e cansaço. Quando a doença se instala no pulmão o quadro clínico mais frequente é a tosse com expectoração às vezes sanguinolenta (hemoptise), dor torácica e dificuldade para respirar (FIUZA DE MELO; AFIUNE, 1993; KRITSKI; FIUZA DE MELO, 2007).

A persistência de tosse por mais de três semanas é um importante fator preditivo de TB pulmonar nos adultos que são denominados de sintomáticos respiratórios. Na disseminação hematogênica do Mtb pode ocorrer o desenvolvimento da TB miliar que é a forma mais grave da doença e com grande risco de atingir as meninges (BRASIL, 2010a). Outras espécies de micobactérias podem apresentar quadros clínicos semelhantes ao CMtb, sendo necessário isolar e identificar o microrganismo pela cultura e testes bioquímicos. Outras enfermidades podem apresentar sinais e sintomas compatíveis com a TB pulmonar como as pneumonias, micoses pulmonares, histoplasmose, sarcoidose e carcinoma brônquico que devem ser investigadas e afastadas para conclusão diagnóstica de TB pulmonar (BRASIL, 2008).

2.10 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR

2.10.1 Diagnóstico por critérios clínicos e epidemiológicos

Considerando que o portador de TB pulmonar ativa é o principal responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença, identificar, diagnosticar e tratar o mais precocemente possível o doente é a mais importante medida para controle da TB.

A suspeita clínica com base nos sinais e sintomas que o doente apresenta é o primeiro passo para o diagnóstico da TB pulmonar. Esses sintomas são inespecíficos e podem ser confundidos com outras patologias respiratórias. O critério epidemiológico individual também é importante e deve-se considerar se o indivíduo manteve contato com doente de TB ou se recentemente fixou residência ou fez viagem a localidades com alta prevalência de TB. Portanto, é necessário fazer o diagnóstico diferencial da TB com outras doenças que apresentam o mesmo aspecto clínico (NORBIS *et al.*, 2013).

Em situações em que o diagnóstico laboratorial não pode ser realizado, o médico pode confirmar o caso, considerando além da história clínica e epidemiológica do paciente, os resultados de exames complementares como a radiografia de tórax e tomografia computadorizada do tórax, broncoscopia e prova tuberculínica ou reação de Mantoux. Entretanto, a conclusão diagnóstica baseada em critérios clínicos, imagem, broncoscopia, ou prova tuberculínica, devido à baixa sensibilidade e especificidade desses métodos, podem levar a resultados falso-positivos com tratamentos indevidos ou falso-negativos que irão evoluir para quadros mais graves pela falta de tratamento (KRITSKI; FIUZA DE MELLO, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (2016) recomenda que a confirmação de caso de TB seja realizada mediante a identificação do microrganismo em, pelo menos, um exame laboratorial. Portanto, para definição de casos de TB pulmonar bacilífera por resultados de exames, o paciente deve apresentar um dos seguintes critérios: duas BD positivas ou uma BD positiva e cultura positiva ou uma BD positiva e imagem radiológica sugestiva de TB. Enquanto que na TB pulmonar escarro negativo, o paciente deve ter as duas BD negativas, mas, com imagem radiológica sugestiva de TB e outros achados clínicos ou exames complementares que permitam ao médico concluir o diagnóstico da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

2.10.2 Diagnóstico por imagem e broncoscopia

Os métodos de diagnóstico por imagem são importantes na avaliação das doenças torácicas. A radiografia do tórax (Raio-X do tórax), juntamente com a baciloscopia do escarro, ainda é um método utilizado no diagnóstico e para acompanhar a evolução do tratamento dos pacientes com TB. O Raio-X do tórax também pode ser utilizado como método de triagem no diagnóstico da TB em populações confinadas, como em presidiários, nas quais a incidência da doença é extremamente elevada (CAPONE *et al.*, 2012). Também é

útil no acompanhamento da evolução radiológica em casos que não respondem ao tratamento; identifica outras doenças associadas em pacientes com BD negativa ou positiva e serve para diferenciação das formas de TB atípicas de outras pneumopatias nos pacientes com HIV/AIDS ou outras imunodepressões (BRASIL, 2011; DALEY *et al.*, 2007).

A tomografia computadorizada, por ser mais sensível e específica do que a radiografia do tórax tem sido utilizada como um excelente instrumento diagnóstico da TB nos casos com baciloscopia do escarro negativa para BAAR ou quando a radiografia do tórax mostra alterações duvidosas (CAPONE *et al.*, 2012). Apesar de ser um método de alta complexidade, torna-se útil diante de exames radiológicos inconclusivos (JEONG; LEE, 2008; LANGE; MORI, 2010).

A ressonância magnética do sistema nervoso central é importante ferramenta diagnóstica em casos de meningoencefalites por TB. Como o diagnóstico precoce está associado a menor morbimortalidade, o exame de neuroimagem com contraste deve ser o primeiro exame a ser realizado (BRASIL, 2011).

Atualmente, a Tomografia por Emissão de Pósitron que utiliza ¹⁸fluorodeoxiglicose está demonstrando resultados promissores no monitoramento da atividade da TB e na resposta ao tratamento pela detecção da atividade de células inflamatórias de mamíferos (WALLIS *et al.*, 2013).

A broncoscopia quando é realizada em imunodeprimidos, como os infectados pelo HIV/AIDS com baciloscopia negativa pode afastar a suspeita de outras doenças pulmonares. As amostras biológicas (lavado brônquico, lavado broncoalveolar, escovado brônquico, biópsia brônquica, biópsia transbrônquica e punção aspirativa com agulha) coletadas nesse exame são importantes para realização da pesquisa de BAAR (BRASIL, 2008).

2.10.3 Prova tuberculínica ou Reação de Mantoux

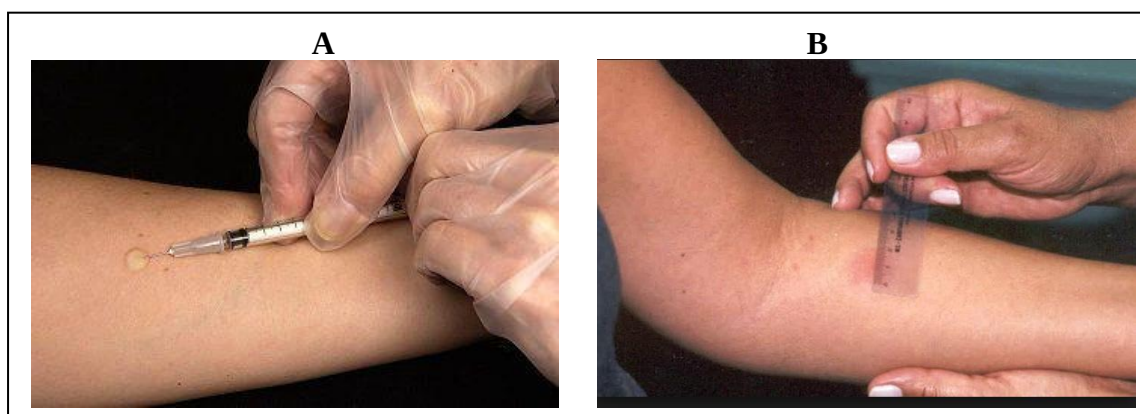
A prova tuberculínica é realizada pela aplicação intradérmica do PPD (*Purified Protein Derivative* - derivado purificado de fração proteica antigênica do bacilo) na dose de 0,1 mL (0,04 mcg), no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo conforme demonstrado na Figura 6A. Auxilia no diagnóstico da TB em pessoas não vacinadas com BCG e sem a infecção pelo HIV (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003).

Essa prova quando positiva isoladamente indica apenas a presença do bacilo no organismo, ou seja, a infecção tuberculosa latente e não é conclusiva para fechar o

diagnóstico da doença. O resultado da prova deve ser registrado em milímetros como demonstrado na Figura 6B. Os termos para classificação isolada da prova tuberculínica em “não reator”, “reator fraco” e “reator forte” não são mais recomendados, pois, a interpretação do teste e seus valores de corte podem variar de acordo com a população e o risco de adoecimento (BRASIL, 2011).

Reações falso-positivas podem ocorrer em indivíduos infectados por MNT ou vacinados pelo BCG, principalmente se vacinados (ou revacinados) após o primeiro ano de vida, quando o BCG produz reações maiores e mais duradouras. Entretanto, a reação tende a diminuir com o passar do tempo, e se o teste tuberculínico for realizado 10 anos ou mais após a última vacinação, o efeito da BCG sobre ela poderá ser mínimo (MENZIES, 1999; MENZIES *et al.*, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1955; RUFFINO-NETTO, 2006). No Brasil, a cobertura pela vacinação com BCG é obrigatória e geralmente é realizada nos primeiros dias de vida (BRASIL, 2011).

Figura 6 – Aplicação (A) e leitura (B) do teste tuberculínico



Fonte Pinheiro (2017)

2.10.4 Diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar

Considerando que a TB pulmonar é a forma predominante da doença, a maioria das amostras biológicas é de origem respiratória tais como: escarro espontâneo, escarro induzido, lavado bronco alveolar, escovado brônquico, fragmentos de tecido pulmonar, aspirado transtraqueal e lavado gástrico (BRASIL, 2008). Entre essas, a mais frequente é o escarro espontâneo (expectoração espontânea) que é facilmente obtido e tem maior riqueza bacilar. O escarro é um produto viscoso que provém da árvore brônquica, constituído por muco, fragmentos de tecidos necrosados (debris), secreções bronco-pulmonares e orofaríngeas.

O escarro é expelido pelo esforço da tosse e pode se apresentar como saliva, mucopurulento, sanguinolento ou liquefeito. Normalmente, a parte sanguinolenta contém poucos bacilos, porque o sangue passa pouco tempo em contato com a lesão tuberculosa rica em microrganismos. Secreções provenientes do muco nasal, da orofaringe e saliva são inadequadas para realização da BD, por induzirem a resultados falso-negativos, mesmo assim, devem ser examinadas, pois, existe alguma possibilidade de encontrar bacilos (FUJIKI, 2005).

Para obtenção de uma boa amostra de escarro, o paciente deve ser orientado de como fazer a coleta tendo em vista que a sensibilidade dos métodos laboratoriais depende da qualidade da amostra fornecida. O volume ideal de escarro é de 5 a 10 mL, depositado em pote descartável com capacidade de 35 a 50 mL, altura mínima de 40 mm, com boca larga, tampa rosqueável e de plástico transparente. Volumes menores não devem ser rejeitados desde que a qualidade seja satisfatória (BRASIL, 2005, 2008).

As amostras coletadas para o controle do tratamento devem ser examinadas independentemente da qualidade e quantidade. O escarro não deve permanecer por muito tempo à temperatura ambiente, para não torná-lo liquefeito e com aspecto muco-coloidal. Uma amostra clínica insuficiente ou inadequada interfere no resultado final do diagnóstico microbiológico. O escarro deve ser mantido em temperatura entre 2°C e 8°C e pode ser utilizado para realização de baciloscopia e cultura por até sete dias. Para o transporte das amostras até o laboratório deve-se evitar a incidência de luz solar direta e evitar o risco de derramamento (PFYFFER; BROWN-ELLIOTT; WALLAC, 2003).

Para aumentar a probabilidade de se obter um resultado positivo, a OMS recomenda coletar duas amostras de escarro por paciente, a primeira na própria unidade de saúde mesmo sem o paciente estar em jejum, mas, com a boca limpa e sem resíduos alimentares e a segunda na manhã seguinte, ao despertar, em jejum, após bochecho com água para remoção de resíduos da orofaringe. Essa amostra é mais rica em bacilos devido à movimentação ciliar noturna que impulsiona o muco até a faringe para manter a umidade das vias aéreas causando o acúmulo de secreção, geralmente mucopurulenta, na faringe, daí o muco é expelido pela tosse ou deglutido e as micobactérias presentes nesse muco são destruídas pela ação do suco gástrico (GUYTON; HALL, 1997).

A coleta de escarro induzido é indicada aos pacientes com pouca secreção ou que não conseguem coletar espontaneamente o escarro. É um procedimento importante no controle de tratamento e em pacientes com AIDS, pois, garante a qualidade da amostra. É feita após nebulização com solução salina hipertônica (5 ml de NaCl 3%) por 5 a 20 minutos. Esse procedimento é bastante útil para o diagnóstico microbiológico da TB, deve ser realizado na

Unidade de Saúde em sala especial com sistema de exaustão por pressão negativa, na presença de profissional treinado. Todos os procedimentos de biossegurança devem ser adotados para evitar a contaminação do ambiente pela tosse do paciente com formação de aerossóis (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2002).

Para confirmação da origem brônquica da amostra de escarro, que é a ideal para pesquisa microbiológica da TB, deve ser confeccionado um esfregaço para coloração pelo método de Gram e leitura em microscópio para estabelecer a relação entre o número de células epiteliais e o número de leucócitos encontrados. O escarro, definido como material inflamatório das vias aéreas inferiores, deve conter maior número de leucócitos que células epiteliais nos campos microscópicos observados (MORITZ *et al.*, 2008).

Quanto à coleta de amostra biológica por lavado brônquico ou broncoalveolar (LBA), aspirado transtraqueal e lavado gástrico, os procedimentos devem ser realizados por equipe médica especializada no momento da broncoscopia. O volume ideal é acima de 5 mL, deve ser depositado em frasco estéril com tampa que evite derramamento, ser mantido à temperatura ambiente e chegar ao laboratório em até 4 horas após coleta (BRASIL, 2008).

Para o aspirado transtraqueal, deve-se coletar o maior volume possível e deve chegar ao laboratório à temperatura ambiente num tempo inferior a 2 horas após coleta.

O lavado gástrico geralmente é realizado em crianças que não sabem escarrar e deglutem as secreções provenientes da árvore brônquica. Este procedimento é realizado em hospital, ao acordar, antes de levantar e em jejum. Devem ser coletadas duas amostras em dias consecutivos, em frasco estéril com solução tampão de carbonato de sódio a 10% para neutralizar a ação do suco gástrico. Transportar a amostra em temperatura ambiente e chegar ao laboratório em até 1 hora após coleta (BRASIL, 2008).

Os principais testes laboratoriais para diagnóstico da TB pulmonar são: a baciloscopia direta (BD) do escarro (pesquisa de BAAR), cultura, exame anatomopatológico (histológico e citológico), exames bioquímicos, exames sorológicos e testes moleculares (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

2.10.4.1 Baciloscopia direta do escarro

A BD apesar de ter sido desenvolvida há mais de 100 anos, ainda é a principal ferramenta para diagnóstico da TB pulmonar bacilífera em todo mundo. É um método seguro, rápido, de fácil execução e de baixo custo sendo um procedimento de diagnóstico apropriado para uso em países subdesenvolvidos e com alta carga da doença (CAMPELO *et al.*, 2001).

Por não ser espécie-específica, apenas uma baciloscopia positiva, não é suficiente para afirmar que é *Mtb* e confirmar a doença, uma vez que outras micobactérias têm as mesmas propriedades morfotintoriais (EAMRANOND; JARAMILLO, 2001; MARTIRE, 2009; PERKINS; CUNNINGHAM, 2007).

A BD é um método de diagnóstico cuja sensibilidade pode variar numa faixa de 25% a 65% quando comparada à cultura. Em pacientes imunocompetentes com a forma pulmonar bacilífera a sensibilidade fica em torno de 55 a 60% enquanto que as crianças e os coinfectados com HIV/AIDS, por desenvolverem a forma pulmonar paucibacilar, a sensibilidade pode chegar a 25% (MIÖRNER *et al.*, 1996; STEINGART *et al.*, 2007a). O número mínimo de BAAR necessário para produzir um esfregaço positivo tem sido estimado entre 5.000 a 10.000 por mililitro de escarro, conforme descrito no Quadro 2 (BRASIL, 2008; KENT; KUBICA, 1985; LAWSON *et al.*, 2006; RODRIGUES; VADVAI, 2012; STEINGART, 2006).

Estudos apontam que a sensibilidade da BD varia com o tipo de lesão, a qualidade e o número de amostras examinadas, a atenção e persistência do microscopista. Esses fatores ao serem considerados pode elevar a sensibilidade do método até 90%. Os doentes com lesões cavitárias expõem grande quantidade de bacilo no escarro e são facilmente detectados pela BD. A sensibilidade da BD pode ser melhorada quando se analisa mais de uma amostra por paciente. Estudos demonstraram que o incremento a partir da primeira amostra tem sido de 80 a 82%, a partir da segunda é 10 a 14% e a partir da terceira baciloscopia é de 5 a 8% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1998).

Quadro 2 - Número de BAAR observados nas baciloskopias, concentrações de bacilos cultiváveis nos escarros e probabilidade de resultados positivos

Número de bacilos observados	Concentração estimada de bacilos por mL de escarro	Probabilidade de um resultado positivo
0 em 100 ou mais campos	Menos do que 1000	Menos do que 10%
1-2 em 300 campos	5.000-10.000	50%
1-9 em 100 campos	Aproximadamente 30.000	80%
1-9 em 10 campos	Aproximadamente 50.000	90%
1-9 por campos	Aproximadamente 100.000	96,2%
10 ou mais por campo	Aproximadamente 500.000	99,95%

Fonte: Brasil (2008)

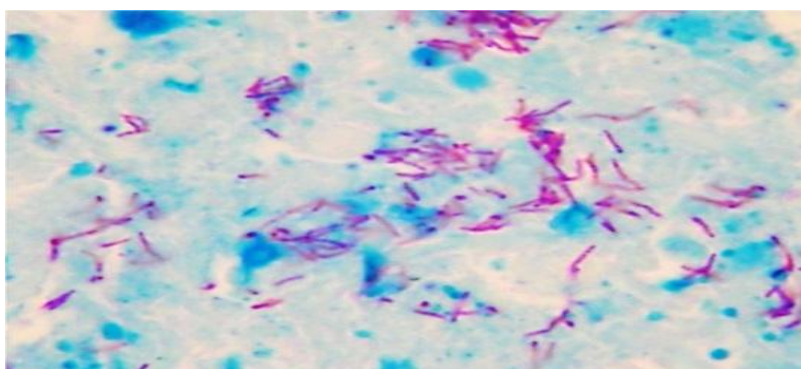
Uma baciloscopia com resultado negativo em indivíduos com evidência clínica e epidemiológica de TB não exclui a doença, pois, um número considerável de doentes apresentam baciloscopia negativa (PALHARES *et al.*, 1996) e, no diagnóstico inicial, 50% dos casos novos de TB pulmonar a baciloscopia é negativa (DESJARDIN *et al.*, 1999).

A ausência de baciloscopia positiva, por falha na sensibilidade do teste, é um sério problema no diagnóstico da TB, principalmente quando outros testes não estão disponíveis. Por recomendação do Ministério da Saúde do Brasil, em locais onde outros métodos de diagnóstico microbiológicos ou de biologia molecular não estiverem disponíveis, a BD deve ser realizada nas seguintes situações: em pacientes com imagem radiológica pulmonar alterada, nos contatos de indivíduos com TB pulmonar bacilífera e durante o tratamento para acompanhar o controle bacteriológico do paciente, preferencialmente mensal e, obrigatoriamente, ao término do segundo, quarto e sexto mês de tratamento (BRASIL, 2011).

Para a pesquisa de BAAR é necessário coletar duas amostras de escarro do indivíduo com sintomas respiratórios, a primeira deve ser coletada no momento da consulta médica e para a segunda, o paciente deve ser orientado a fazer a coleta em casa, pela manhã, ao despertar e em jejum. O exame é realizado em um esfregaço da amostra clínica preparado em lâmina de vidro e fixado pelo calor submetido à coloração pelo método Ziehl-Neelsen e pelo método de Kinyoun que utilizam como corante específico a carbol-fuccina a quente e a frio respectivamente. Os bacilos são visualizados em microscópio óptico convencional (de campo claro) em objetiva de imersão, e os bacilos se apresentam corados em vermelho sobre uma coloração de fundo do azul de metileno como pode ser visualizado na 7 (BRASIL, 2008).

A coloração pelo método de Kinyoun é indicada, para *Mycobacteria* spp, *Nocárdia* spp, e outros bacilos Gram positivos ramificados que se coram fracamente pela coloração de Ziehl-Neelsen (KINYOUN, 1915).

Figura 7- Bacilos da tuberculose corados pelo método de Ziehl-Neelsen



Fonte: Universidade de Campinas (2016)

Segundo critérios da Organização Mundial da Saúde, a leitura microscópica e interpretação dos resultados da baciloscopia do escarro corada pelo método de Ziehl-Neelsen, tanto após concentração quanto pelo método direto tradicional, se baseiam no número de bacilos encontrados por campo microscópico, conforme demonstrado no Quadro 3.

Quadro 3 - Critérios da OMS para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia de escarro, após concentração ou não, corada pelo método de Ziehl-Neelsen

Condição	Resultados
Não foram encontrados BAAR em 100 campos	Negativo
Quando foram encontrados de 1 a 9 BAAR em 100 campos	Relata-se a quantidade de BAAR encontrada
Quando foram encontrados de 10 a 99 BAAR em 100 campos	Positivo (+)
Quando foram encontrados em média de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos	Positivo (++)
Quando a quantidade de BAAR encontrada foi acima de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos	Positivo (+++)

Fonte: Brasil (2008)

Portanto, apesar da baixa sensibilidade, a BD continua sendo a principal ferramenta utilizada no diagnóstico da TB pulmonar e extrapulmonar, principalmente nos países subdesenvolvidos com recursos limitados.

2.10.4.2 Baciloscopia por microscopia de fluorescência com Auramina O

O Ministério da Saúde orienta que nos laboratórios onde sejam examinadas mais de 50 amostras de escarro diariamente, pode-se optar pela utilização da Microscopia por Fluorescência com Auramina “O” para triagem de casos (CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 2002).

Estudos demonstraram que a microscopia de fluorescência aumenta a positividade em 10% quando comparada com a BD convencional, mas, a especificidade é menor nos indivíduos infectados pelo HIV (CATTAMANCHI *et al.*, 2009; STEINGART *et al.*, 2006).

A microscopia de fluorescência é um bom método de triagem por ser mais sensível e reduzir o tempo de leitura dos esfregaços negativos. Essas vantagens são atribuídas à

utilização da objetiva de 25 vezes para análise microscópica do escarro, enquanto que na microscopia de campo claro, a leitura é realizada em objetiva de imersão (100X). Nesse método, cada campo microscópico examinado é 25 vezes maior que pela objetiva de imersão, além disso, torna-se mais fácil a visualização dos bacilos fluorescentes (ABRAHÃO, 1998; PARDO *et al.*, 2001). Entretanto, os casos positivos nos esfregaços corados com a auramina, deverão ser confirmados pelo método de coloração de Ziehl-Neelsen (Quadro 4). Isso permitirá a emissão do resultado de acordo com os critérios de leitura padronizados pela OMS para o método de Ziehl-Neelsen (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1998).

A microscopia de fluorescência se contrapõe as vantagens da BD, por ser um método mais caro, necessita da aquisição de um microscópio de fluorescência e de profissionais treinados, limitando o seu uso na maioria dos laboratórios de saúde pública (STEINGART *et al.*, 2006).

Quadro 4 - Interpretação de resultados da pesquisa de BAAR pelos métodos de coloração de Ziehl-Neelsen, Kinyoun e Auramina

Resultado	Número de microrganismos	
	Auramina objetiva 25x	Ziehl-Neelsen e Kinyoun objetiva 100x
Negativo	0	0
Duvidoso repetir a coloração	1-2/30 campos	1-2/300 campos
++ (raros)	1-9/100 campos	1-9/10 campos
+++ (alguns)	1-9/campo	1-9 /10 campos
++++ (frequentes)	10-90/ campo	1-9/ campo
+++++ (numerosos)	> 90/campo	> 9/campo

Fonte: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (2008)

Atualmente, novas opções como o uso da microscopia fluorescente de diodos emissores de luz (do inglês Light Emitting Diode-LED), microscópios portáteis de fluorescência que também funcionam com bateria diminuiram os custos desse método e poderá facilitar o uso dessa ferramenta (ANTHONY *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2010).

A sensibilidade dos métodos de coloração de Ziehl-Neelsen, Kinyoun e Auramina está em torno de 22 a 81% e também não possuem boa especificidade uma vez que outros microrganismos que não micobactérias podem aparecer corados (ex: *Nocardia*, *Rhodococcus*, entre outros). Quando são visualizados apenas 1 a 2 bacilos em toda a lâmina deve-se preparar

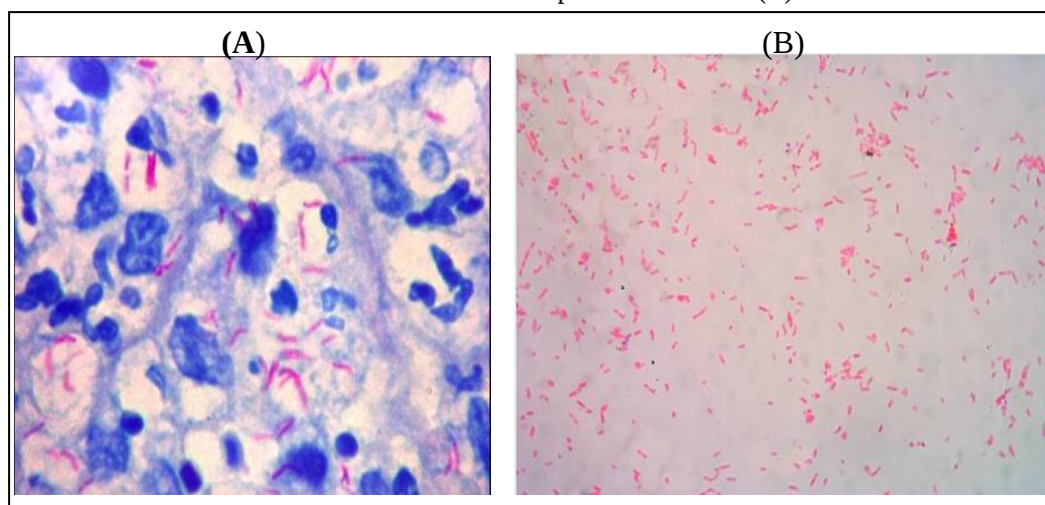
outro esfregaço e repetir a pesquisa para confirmação do resultado. Somente após a segunda lâmina, se o resultado persistir, o médico solicitante deverá ser comunicado sobre o achado laboratorial (CATTAMANCHI *et al.*, 2010).

A busca para melhorar o desempenho da baciloscopia tem conduzido os pesquisadores a realizarem estudos empregando produtos químicos para tratamento prévio do escarro, seguidos de concentração dos bacilos por sedimentação espontânea *overnight* ou por centrifugação. Os produtos mais utilizados são N-Acetil-L-Cisteína (NALC)/Hidróxido de sódio (NaOH) e o hipoclorito de sódio (NaOCl) (CATTAMANCHI *et al.*, 2010; LAWSON *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2009).

O NaOCl é um dos produtos químicos mais testados para melhorar a sensibilidade da baciloscopia tradicional, por ser um alvejante amplamente disponível e de baixo custo é ideal para uso em países de baixa renda. As propriedades desinfetantes do NaOCl podem melhorar o controle de infecção pelo Mtb em laboratórios que não possuem instalações adequadas para garantir as condições de biossegurança (BEST *et al.*, 1990; CATTAMANCHI *et al.*, 2010) necessárias para conter os aerossóis formados na manipulação das amostras biológicas contaminadas por microrganismo de classe de risco 3. Estudos relatam que o NaOCl aumentou a sensibilidade da baciloscopia, principalmente devido a digestão do muco e detritos do escarro, que facilita a precipitação dos bacilos no fundo do tubo, bem como, ao confeccionar e corar o esfregaço com os corantes específicos para BAAR, este procedimento, quando comparado a BD, resulta em campos microscópicos mais limpos como visto na figura 8, facilitando a identificação dos bacilos (BONNET *et al.*, 2008; CATTAMANCHI *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos são bastante variados, com aumento da sensibilidade em comparação com a BD, principalmente quando o material foi centrifugado (PADMA; KAMESH; DALEY, 2009). O método que realiza a baciloscopia após digestão do escarro com hipoclorito de sódio e adição de etanol seguido de concentração da amostra de escarro por passagem em membrana filtrante de policarbonato, com poros de 25 mm de diâmetro por 1,0 µm, sob pressão negativa, aumentou em 24,4% a positividade em comparação com BD (SMITHWICK; STRATIGOS, 1981). Modificação nesta técnica foi realizada por redução do tamanho dos poros da MFP e elevou a sensibilidade da baciloscopia para níveis próximos aos da cultura (FENNELLY *et al.*, 2012). Contrapõe-se às vantagens da BD por ser necessário o uso de centrifugas que nem sempre estão disponíveis nos laboratórios e o aumento da carga de trabalho além da aquisição de novos insumos.

Figura 8 - Comparação de lâminas positivas para BAAR e pela baciloscopia direta (A) e após tratamento da amostra com hipoclorito de sódio (B)



Fonte: Universidade de Campinas (2016)

2.10.4.3 Cultura para micobactérias

Dos testes laboratoriais para diagnóstico de micobactérias, a cultura é considerada o padrão-ouro para diagnóstico da tuberculose e avaliação da acurácia de outros métodos, pois, apresenta elevada sensibilidade e especificidade (FERREIRA *et al.*, 2005; VAN RIE *et al.*, 2010). O crescimento do bacilo em meio de cultivo permite a realização de estudos complementares por técnicas de biologia molecular, identificação bioquímicas das espécies e testes de sensibilidade às drogas (BRODIE; SCHLUGER, 2005; VAN RIE *et al.*, 2010). A cultura e a baciloscopia quando realizadas conjuntamente conferem mais agilidade ao diagnóstico para início do tratamento e propicia maior eficiência no controle da doença (BRASIL, 2008).

Antes da realização da cultura, a amostra clínica deve ser tratada com produtos químicos (ácidos-bases) específicos para fluidificação do muco e eliminação de microrganismos contaminantes sem inviabilizar o Mtb. Os métodos de descontaminação mais utilizados são: Lauril Sulfato de Sódio, Corper & Stoner Modificado que utiliza o fosfato monossódico e trissódico e o Método de Petroff utiliza hidróxido de sódio a 4% mais a etapa de neutralização com ácido na presença de um indicador de pH (CENTRO DE REFERÊNCIA PORFESSOR HÉLIO FRAGA, 2005). O Hidróxido de Sódio (NaOH), é o mais utilizado pois, tem propriedades fluidificante e descontaminante. Por ser uma substância alcalina drástica num percentual de 4%, que é considerado alto, tanto a concentração de uso como o tempo em contato com a amostra são críticos e devem ser cuidadosamente observados (BRASIL, 2008).

O método Lauril Sulfato de Sódio é menos agressivo aos microrganismos por utilizar o NaOH em menor concentração. Os produtos químicos utilizados na descontaminação possuem atividade mucolítica, ao liquefazerem a matéria orgânica facilita a sedimentação do bacilo que possui baixa gravidade específica pela alta quantidade de lipídios na composição de sua parede celular (CENTRO DE REFERÊNCIA PORFESSOR HÉLIO FRAGA, 2005; PETROFF, 1951).

O N-acetil-L-cisteína (NALC) é um agente mucolítico utilizado em combinação com o NaOH. Como não tem efeito direto sobre as micobactérias, permite que seja usada uma concentração de NaOH de 2%. Dessa maneira, a combinação NALC-NaOH é indicada para tratamento de amostras paucibacilares, sendo recomendada para a maioria dos sistemas comerciais de cultura com meios líquidos (BRASIL, 2008).

A cultura pode ser realizada em meios sólidos ou meio líquido. Os meios de cultura sólidos mais utilizados são o Lowenstein-Jensen (L-J) e o Ogawa-Kudoh (O-K), ambos produzidos à base de ovo coagulado. O meio Lowenstein-Jensen utiliza o glicerol como fonte de carbono e a asparagina como fonte de nitrogênio. No meio O-K, utiliza como fonte de nitrogênio o aminoácido glutamato de sódio, mais acessível com menor custo (KUDOH; KUDOH, 1974).

O meio de cultura O-K se assemelha na composição ao Lowenstein-Jensen, é preparado à base de ovo, utiliza o corante verde-malaquita para inibir o crescimento dos microrganismos contaminantes da amostra biológica que, por se desenvolverem rapidamente no meio de cultura, prejudica o crescimento das micobactérias que são de crescimento lento em meios de cultivo (BRASIL, 2008; PEDRO *et al.*, 2011).

O método de O-K quando comparado com o Lowenstein-Jensen a preparação é mais simples e rápida e apresenta as vantagens de eliminar as etapas de descontaminação e centrifugação do escarro que são procedimentos formadores de aerossóis, garantindo mais segurança para o profissional de laboratório (TAKAO *et al.*, 2005). Além disso, é suficientemente sensível para confirmar o diagnóstico da TB pulmonar ativa em pacientes com resultado de baciloscopia negativa. De acordo com KUDOH, a cultura por esse método aumenta o rendimento diagnóstico em 20 a 40%, sendo apropriado para implantação em locais de difícil acesso (KUDOH; KUDOH, 1974; PEDRO *et al.*, 2011).

Outros meios sólidos que também são utilizados é o Middlebrook 7H10 agar e o 7H11 agar. Middlebrook e Cohn (1958) melhoraram a formulação do ágar com ácido oleico e albumina, desenvolvida inicialmente por Dubos e Middlebrook (1947), e obtiveram um crescimento mais rápido e mais exuberante das espécies de Mtb. O meio Middlebrook 7H10

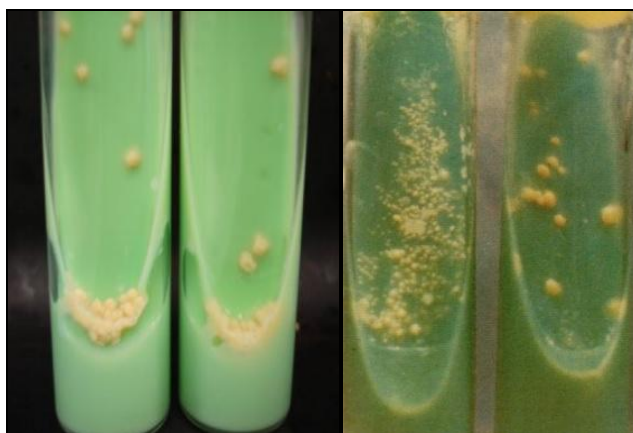
além de diminuir a probabilidade de crescimento de contaminantes quando comparado com os meios preparados à base de ovo (KUBICA; DYE, 1967; MIDDLENBROOK; COHN, 1958). O glicerol é a fonte de carbono e energia, o ácido oleico é importante no metabolismo das micobactérias e a albumina protege os bacilos contra agentes tóxicos, enquanto que o verde malaquita inibe o desenvolvimento de flora contaminante (BECTON DICKINSON, 2012).

Os meios com base de ágar possuem a vantagem de não sofrerem liquefação por organismos proteolíticos contaminantes e são indicados para semeio de amostras biológicas provenientes de sítios não estéreis, pois, torna possível a observação de colônias de micobactérias após 10 a 12 dias de incubação por meio de um microscópio estereoscópio mesmo na presença de organismos contaminantes. Além disso, retêm concentrações exatas de medicamentos adicionados, diminuindo a inativação dos medicamentos quando comparado com as preparações a base de ovo (BECTON DICKINSON, 2012).

O Ágar Middlebrook 7H11 é uma modificação do ágar especial Middlebrook 7H10, recomendado por Cohn, Waggoner e McClately que adicionaram a digestão enzimática de caseína para o fornecimento de nitrogênio, vitaminas e aminoácidos e descobriram que o crescimento de organismos exigentes como cepas de *M. tuberculosis* foi estimulado e o teste de suscetibilidade aprimorado (BECTON DICKINSON, 2012; KUBICA; DYE, 1967).

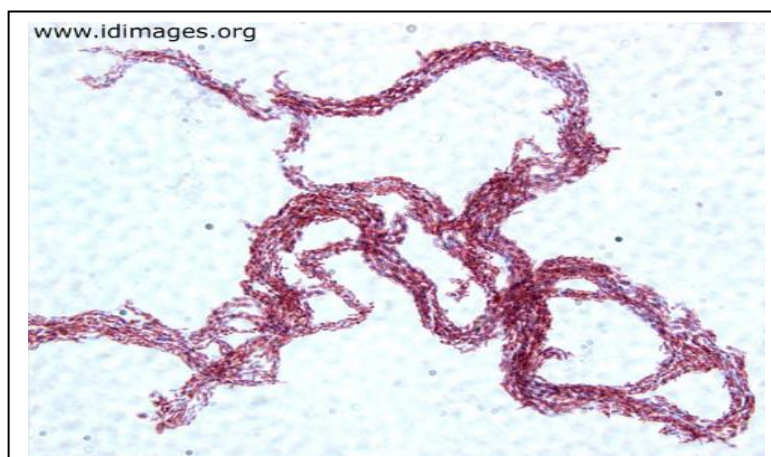
O Mtb se desenvolve na superfície dos meios de cultura com a formação de colônias secas, rugosas, acromógenas, com aspecto de couve-flor de acordo como a demonstração na Figura 9. Enquanto que na lâmina corada pelo método de Ziehl-Neelsen é possível visualizar ao microscópio óptico a formação do fator corda conforme apresenta a Figura 10.

Figura 9 - Crescimento de Mtb em Meios Ogawa-Kudoh e Lowenstein-Jensen



Fonte: Loredó *et al.* (2012)

Figura 10 - Fator corda-Coloração de Ziehl-Neelsen



Fonte: Partners Healthcare (2016)

Os critérios para leitura das culturas em meio sólido, tem como base a contagem aproximada do número de colônias (escala semi-quantitativa) desenvolvidas na superfície do meio, conforme demonstrado no Quadro 5 (BRASIL, 2008). Tanto o Lowenstein-Jensen quanto o Ogawa-Kudoh, apesar do custo acessível, quando comparados com outros métodos são mais trabalhosos para a produção e os resultados podem demorar de 15 a 30 dias em culturas positivas e até 60 dias para liberação do laudo definitivo (BRASIL, 2010; VAN RIE *et al.*, 2010).

Quadro 5 - Critérios para leitura das culturas em meio sólido (escala semi-quantitativa)

NÚMERO DE COLÔNIAS	RESULTADO
Colônias confluentes (tapete)	Cultura positiva (+++)
Mais de 100 colônias separadas	Cultura positiva (++)
20 A 100 Colônias	Cultura positiva (+)
Menos de 20 colônias	Cultura positiva (cita o nº de colônias)
Sem crescimento após 60 dias	0 (zero)-Negativa
Contaminado	C

Fonte: Adaptado de Brasil (2008)

Os meios de cultura líquidos, como o Middlebrook 7H9, podem ser utilizados por métodos manuais ou automatizados (GARG *et al.*, 2003) e favorecem o crescimento das micobactérias mais rápido quando comparado aos meios sólidos. Outra vantagem desses meios é a possibilidade de automação da cultura como o Sistema MGIT do inglês

“mycobacteria growth indicator tube” fabricado pela Becton e Dickinson, utiliza um método não radiométrico com o meio líquido Middlebrook 7H9 modificado. O Tubo Indicador de Crescimento Micobacteriano (MGIT), apesar de se basear no princípio do sistema BACTEC 460TB, possui a vantagem de ser totalmente automatizado com capacidade para realizar 960 testes simultaneamente com liberação de resultados de diagnóstico e informação de resistência às drogas em 7 a 10 dias e 10 a 15 dias respectivamente (GIAMPAGLIA *et al.*, 2007), portanto, indicado para grandes rotinas laboratoriais (BRASIL, 2009a; KRITSKI, 2010).

Para obtenção de um resultado positivo na cultura é necessário que haja de 10 a 100 bacilos/mL na amostra de escarro (PALOMINO, 2005). Devido à reprodução lenta dos bacilos, que em alguns casos pode demorar até 12 semanas para conclusão do resultado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016), esse método não é adequado para triagem de casos em locais com altas taxas de incidência da doença (BRASIL, 2011). Assim o portador de TB pulmonar sem tratamento, além de poder ter complicações pelo agravamento do caso, também propaga a infecção entre seus comunicantes, tendo em vista que diagnóstico e tratamento precoces interrompem a transmissão do bacilo e contribuem para o controle da doença (FERREIRA *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 1992). Ademais, a cultura, por concentrar e favorecer a multiplicação das unidades formadoras de colônias (UFC), aumenta consideravelmente o risco de contaminação dos profissionais, exigindo laboratórios mais estruturados e conhecimento de requisitos de biossegurança na manipulação de microrganismos da classe de risco 3 (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009).

A OMS recomenda a realização de cultura em: indivíduos com suspeita clínica de TB pulmonar em que a pesquisa de BAAR for negativa; para diagnóstico de TB extrapulmonar principalmente em pacientes com sorologia positiva para HIV e em crianças. A cultura com teste de suscetibilidade às drogas é recomendada para realização em cepas isoladas de pacientes com suspeita de resistência aos antibióticos; quando a baciloscopia é positiva após o segundo mês de tratamento; em retratamento após falência ao esquema básico; no reinício de tratamento após abandono e nos grupos de risco em desenvolver cepas de *M. tuberculosis* resistente como pessoas em situação de rua, comunicantes de pacientes com TB pulmonar resistente e pessoas vivendo em ambiente confinado como penitenciárias, hospitais e albergues (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

2.10.4.4 Exame anatomopatológico (histológico e citológico)

É um método empregado na investigação das formas extrapulmonares, na TB pulmonar com imagem radiológica difusa como na tuberculose miliar em pacientes com imunossupressão. Nos imunossuprimidos é mais frequente a positividade da baciloscopia no material de biópsia enquanto que nos imunocompetentes a pesquisa de BAAR, geralmente é negativa. No entanto, o único método diagnóstico de certeza de TB é a cultura seguida da confirmação da espécie por testes bioquímicos ou moleculares, daí a necessidade de submeter à cultura material coletado por biópsia (BRASIL, 2011).

Deve ser realizado quando há suspeita clínica de TB extrapulmonar, pois, além de permitir a identificação do *M. tuberculosis* pode ser observado o processo inflamatório granulomatoso compatível com a infecção. No material coletado pela biópsia é importante realizar o exame direto e a cultura, sempre que possível (BRASIL, 2011).

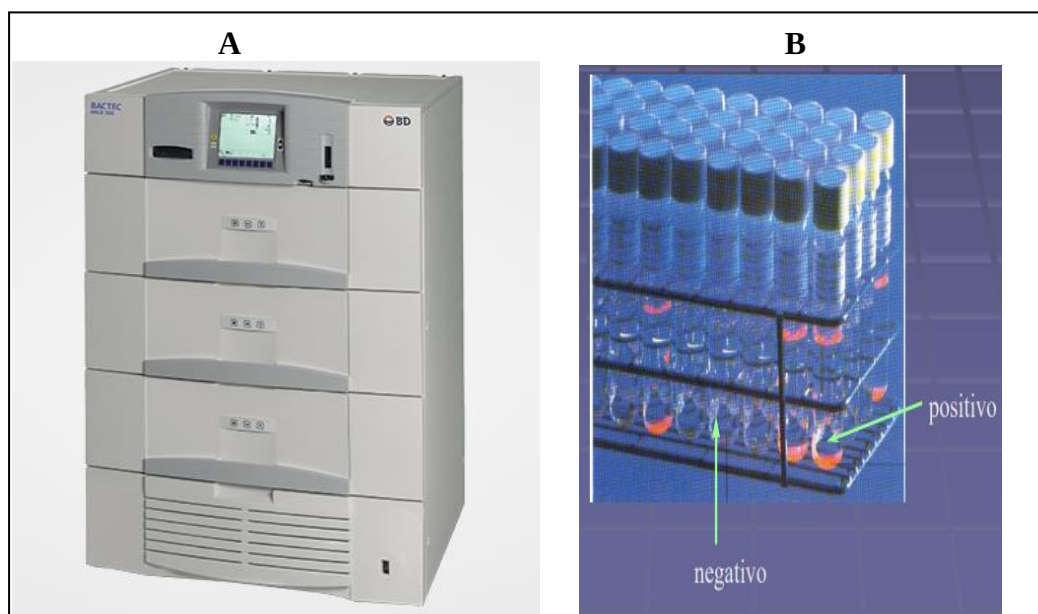
2.10.4.5 Testes fenotípicos: detecção de consumo de oxigênio e detecção do fator corda

A detecção de consumo de oxigênio (O₂) realiza-se por teste não radiométrico que utiliza métodos manuais e automatizados. Os métodos automatizados apresentam a vantagem da rapidez na liberação dos resultados em torno de dez dias. Entretanto, necessitam de maior estrutura laboratorial, equipamentos e recursos financeiros para garantir a funcionalidade. Os métodos mais utilizados até o momento são: o ESP II® da Difco Laboratories, o MB/BacT® da Biomerieux e o MGIT® (*Mycobacteria Growth Indicator Tube-MGIT*) da Becton Dickinson (TORTOLI *et al.*, 2002). Enquanto que a detecção do fator corda é um método manual que se baseia no crescimento das micobactérias em meio líquido. Após oito dias de inoculação é possível visualizar fator corda formado pela micobactéria em crescimento. Estudos sugerem que a sensibilidade e especificidade deste teste estão no mesmo patamar da cultura tradicional. Requer boas práticas de laboratório, barreiras de contenção apropriadas que devido ao risco de contaminação com o manuseio de meio líquido em placas de Petri os profissionais devem ser altamente treinados em biossegurança para manipulação de microrganismo da classe de risco 3 (ARIAS *et al.*, 2007).

2.10.4.6 MGIT960 (mycobacteria growth indicator tube) e ETEST

Esses testes são utilizados para detecção de TB resistente aos fármacos, onde o Sistema Tubo Indicador de Crescimento Micobacteriano - MGIT 960 conforme demonstra a Figura 11A, que utiliza o meio Middlebrook 7H9 em tubos com silicone impregnado com o metal rutênio e um sensor que indica o consumo de oxigênio pelas micobactérias com apresentado na Figura 11B (BRASIL, 2008). É um equipamento fabricado pela Becton Dickinson, totalmente automatizado, não radiométrico que em estudos de validação no Brasil demonstrou desempenho similar ao sistema radiométrico Bactec 460TB considerado referência para o diagnóstico de TB resistente, o método das Proporções e o método de Razão da Resistência, (GIAMPAGLIA *et al.*, 2007). O uso deste equipamento foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para teste de resistência do *M. tuberculosis* a estreptomicina (SM), isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e etambutol (EMB).

Figura 11 – Equipamento MGIT960 (A) e tubos positivo e negativo (B)

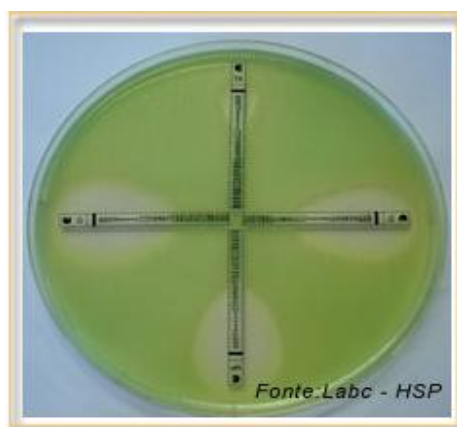


Fonte: Becton Dicson (2017)

Quanto ao Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia), é uma fita plástica disponível comercialmente, impregnada por concentrações crescentes de antimicrobiano na face ventral e marcada, na face dorsal, com a escala das concentrações testadas a fim de facilitar a leitura do resultado como pode ser visto na Figura 12. Este teste baseia-se na difusão do gradiente antimicrobiano no ágar para a determinação da sensibilidade da amostra bacteriana ao antimicrobiano testado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

A preparação do inóculo é feita da mesma maneira que no teste de disco-difusão, é um teste quantitativo com resultado entre 5 a 10 dias após o crescimento de Mtb no meio de cultura. Apresenta elevada concordância com o método de proporções para a detecção de cepas multirresistentes, sendo uma boa opção nos países em desenvolvimento para diagnóstico rápido da resistência micobacteriana (BRASIL, 2011).

Figura 12 - Teste de sensibilidade a antimicrobianos pela técnica de Etest®



Fonte: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (2008)

2.10.4.7 Imunodiagnóstico da tuberculose, testes bioquímicos e ensaios para detecção de interferon gama

Na última década, métodos de diagnóstico sorológico para detecção de muitas doenças infecciosas, como o HIV e malária, foram desenvolvidos para uso em países com poucos recursos e que não necessitam de equipamentos especializados nem de treinamentos intensivo. Nesses ensaios, os antígenos são pré-revestidos em linhas através de uma membrana de nitrocelulose onde são aplicadas amostras de soro ou sangue total e as reações antígeno-anticorpo são visualizadas nessas linhas pela adição de anticorpo anti-humanos ligado a substâncias como o ouro coloidal. Essas tecnologias geralmente são de simples execução, rápidas e de baixo custo, ideal para diagnóstico em unidades de pronto atendimento. Entretanto, esses testes foram aplicados no diagnóstico de TB durante décadas, mas, sem um resultado satisfatório (STEINGART *et al.*, 2007b; STÜRENBURG; JUNKER, 2009).

Atualmente, dezenas de testes sorológicos rápidos que utilizam composições antigênicas variadas para detecção de anticorpos específicos anti-TB estão disponíveis em muitos países de baixa e média renda. Estudo de avaliação comparativa desses testes tendo

como padrão de referência a cultura e o acompanhamento clínico verificou que sensibilidade dos testes variou de 1% a 60% (média, 27%), e a especificidade variou de 53% a 98,7%. O desempenho dos testes foi ainda menor nos casos de pacientes com baciloscopia de escarro negativa e HIV positivos. Do mesmo modo, estudo de revisão posterior com testes comerciais atualmente usados em países endêmicos para TB, também concluiu que não há evidências de eficácia desses testes, principalmente em pacientes HIV positivos e em crianças. Os testes sorológicos ainda podem apresentar reações cruzadas com outros microrganismos (STEINGART *et al.*, 2007b, 2009). Em conclusão, esses testes devem ser considerados com pouco ou nenhum papel no diagnóstico de TB e, nesse momento, nenhum dos ensaios teve desempenho suficiente para substituir a BD no escarro.

Os exames bioquímicos são realizados em casos de TB extrapulmonar, principalmente nas meningoencefalites por TB, nos derrames pleurais e pericárdicos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). A adenosinadeaminase é uma reação bioquímica para detecção em amostras clínicas de uma enzima intracelular, presente nos linfócitos ativados, que pode contribuir para o esclarecimento de diagnóstico da TB ativa. O aumento da atividade da ADA no líquido pleural, associado a parâmetros como idade do paciente menor que 45 anos, predominância de linfócitos acima de 80% e exsudato proteico alto indicam pleurite por TB. Para execução do teste, o laboratório necessita apenas de um espectrofômetro e da disponibilidade de kits no mercado (LIANG *et al.*, 2008; TRAJMAN *et al.*, 2008).

A infecção latente por TB não manifesta sintomas clínicos nem achados bacteriológicos ou radiológicos que evidenciem a infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012) e durante muitos anos o rastreamento da infecção latente tem sido feito mediante a aplicação do teste tuberculínico cutâneo conhecido com “PPD” ou “Mantoux”. Esse teste mede a hipersensibilidade do tipo resposta retardada ao derivado proteico purificado à mistura bruta de antígenos do CMtb. Por ter baixas sensibilidade e especificidade, indivíduos vacinados com a BCG ou expostos a MNT podem gerar um resultado falso positivo (HUEBNER *et al.*, 1993), além de não ser possível distinguir a infecção pelo o Mtb de outras micobactérias do CMtb. Ainda mais, a aplicação e a leitura do teste requerem experiência do profissional de saúde para não resultar em erros de interpretação.

A introdução de ensaios de liberação do interferon gama (IFN- γ) forneceu mais uma alternativa para o diagnóstico da infecção latente (MAZUREK; VILLARINO, 2003). Atualmente, existem dois testes para dosar citocinas que são o QuantiFERON-TB Gold *in*

tube e o T-SPOT.TB chamados *interferon gama release assay* (IGRA), que utilizam antígenos mais específicos do Mtb (CONDE *et al.*, 2009).

De acordo com uma revisão sistemática do desempenho desses ensaios comercialmente disponíveis que usam um coquetel de antígenos específicos do Mtb oferecem vantagens em comparação ao teste tuberculínico convencional. Essas vantagens são: maior sensibilidade e especificidade, melhor correlação com a exposição do organismo a micobactérias do CMtb, menor reatividade cruzada com BCG e MNT e maior potencial para identificar indivíduos com infecção latente, que apresentam risco elevado de desenvolver doença ativa. A acurácia desses testes ainda precisa ser comprovada em grupos populacionais com características específicas, como: pacientes imunocomprometidos (HIV/AIDS), crianças, casos de TB extrapulmonares e multidrogarresistente, infecções por MNT (PAI *et al.*, 2004a; RICHELDI, 2006).

Quanto aos pacientes imunodeprimidos com suspeita de TB, estudos realizados por Guedes *et al.* (2013) avaliaram o desempenho dos testes QuantiFERON®-TB Gold (QFT-GIT) e da PCR único tubo (STNPCR) otimizada por Lima e colaboradores (2009) no diagnóstico da TB em pacientes imunodeprimidos, os quais concluíram que os testes QFT-GIT e STNPCR não foram úteis no diagnóstico da infecção latente em pacientes imunodeprimidos.

Os ensaios para detecção de gama interferon (IGRAs) estão baseados na estimulação da resposta celular usando peptídeos ausentes no BCG e em outras micobactérias atípicas. Esses ensaios detectam a produção de *interferon-gama release Assay* (IGRA) e utilizam amostras de sangue periférico, mas, como acontece com a prova tuberculínica, o IGRA não distingue TB infecção de TB doença. Além disso, a eficácia desses ensaios não foi suficientemente avaliada nas populações especiais, nos indivíduos infectados pelo HIV, em crianças e no diagnóstico da infecção latente (DINNES *et al.*, 2007; PAI *et al.*, 2008).

2.10.4.8 Métodos para detecção direta de *Mycobacterium tuberculosis* pela amplificação de bacteriófagos

Estes métodos utilizam bacteriófagos que infectam e replicam especificamente em micobactérias como indicadores da presença de Mtb viáveis diretamente no espécime clínico. Não requer equipamento especializado e sua leitura é visual, necessitando apenas conhecimento em técnicas básicas de microbiologia (BRASIL, 2011). Entre os testes comercializados, o ensaio FASTPlaque TB® (Biotec Laboratories Ltda., Ipswich, Inglaterra),

encontra-se disponível comercialmente (BRASIL, 2011; KALANTRI *et al.*, 2005; PAI *et al.*, 2005).

Uma meta-análise de estudos sobre o uso de bacteriófagos em *Mtb*, concluiu que o desempenho desses testes não foram superiores aos da BD (KALANTRI *et al.*, 2005). A proposta inicial para utilização dos sistemas baseados em fagos era de oferecer uma abordagem de diagnóstico de baixo custo; no entanto, as descobertas desses estudos indicam que a sensibilidade e especificidade relatadas não viabiliza o seu uso como rotina de diagnóstico da TB (PARSON, *et al.*, 2011).

2.10.4.9 Testes moleculares

Os testes moleculares para diagnóstico da TB são baseados na amplificação e detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos do complexo *M. tuberculosis* em espécimes clínicos, fornecendo resultados em 24-48 h, chamados testes de amplificação de ácidos nucleicos. Recentemente novos testes moleculares foram desenvolvidos para detecção da TB e resistência à rifampicina, para uso em países de elevada carga de TB (BRASIL, 2011).

Os estudos para avaliação da acurácia e custo dos testes de amplificação comercializados, para uso como rotina, apresentaram baixos valores preditivos negativos (não descarta a possibilidade de TB ativa ou resistente). Apesar de permitir o diagnóstico precoce de TB em cerca de 60% dos casos com BAAR negativo (sensibilidade), elevada especificidade e valores preditivos positivos que em regiões de baixa prevalência de infecções por MNT sugere o diagnóstico de TB ativa. Os testes de amplificação de ácido nucleico foram aprovados em países industrializados para uso em amostras respiratórias na suspeita de TB pulmonar, em pacientes adultos, sem história prévia de tratamento anti-TB. Não devem ser utilizados para monitorar o tratamento e não substituem a cultura para micobactérias (BRASIL, 2011; PINTO *et al.*, 2015).

Os primeiros kits comerciais disponibilizados foram *Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test* (Amplicor) da Roche Diagnostic Systems Inc., NJ e *Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test* (MTD) da Gen-Probe Inc., San Diego, CA. Ambos receberam aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA (BRASIL, 2011). Posteriormente, foi disponibilizada versão automatizada do Amplicor, o COBAS Amplicor MTB test da Roche Diagnostics, Switzerland, e mais recentemente, foi introduzido o teste qualitativo COBAS Taq Man MTB que utiliza PCR em tempo real (DALEY *et al.*, 2007; LING, 2008).

Ambos os testes devem ser utilizados em amostras respiratórias positivas na baciloscopia. Interpretação cuidadosa deve ser feita nos casos de pacientes tratados previamente para TB e/ou aqueles co-infectados pelo HIV uma vez que demonstraram maior índice de exames falso-positivos em diversas séries estudadas (DALEY *et al.*, 2007; LING, 2008; PAI *et al.*, 2004b).

Dos testes moleculares para identificação do complexo *M. tuberculosis*, o primeiro método molecular comercializado foi AccuProbe (Gen-Probe Inc.), que identifica o complexo *M. tuberculosis* e outras micobactérias como: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. avium complex*, *M. kansasii* e *M. gordonae*. Os resultados são disponibilizados em 2 horas em material positivo na cultura e, em diferentes estudos, a sensibilidade e especificidade tem sido superior a 90% (LING *et al.*, 2008; PALOMINO, 2009).

Outros testes foram desenvolvidos e comercializados para o rápido diagnóstico do complexo *M. tuberculosis*: INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics NV, Ghent, Belgium), e GenoType MTBC e GenoType *Mycobacterium* (Hain Lifesciences, Nehren, Germany), para uso em amostras positivas na cultura (LING *et al.*, 2008; PALOMINO, 2009). Três ensaios genotípicos rápidos foram desenvolvidos para o diagnóstico da tuberculose multirresistente baseados na presença de mutações de resistência para rifampicina e encontra-se disponíveis no comércio, o kit INNO-LiPA Rif. TB (Innogenetics, Zwijndrecht, Bélgica), o ensaio de GenoType® MDRTB e GenoType® MDRTBplus (BWANGA *et al.*, 2009; PALOMINO, 2009).

Os testes moleculares rápidos permitem o diagnóstico da TB multidroga resistente em 8 horas, ou menos, com tecnologia da amplificação do ácido nucleico (GenoType® MDRTB ou INNO-LiPA Rif. TB). Em estudos publicados, a sensibilidade destes testes para a resistência à rifampicina variou de 92% a 100% e para a resistência à isoniazida de 67% a 88% (BARNARD *et al.*, 2008; BRASIL, 2011; BWANGA *et al.*, 2009; PALOMINO, 2009).

O teste LAMP utiliza amplificação isotérmica, em amostras respiratórias, mostrou sensibilidade de 48% nas amostras negativas a baciloscopia e especificidade de 94% a 99%. Não foram descritos resultados em amostras não respiratórias. Para a realização do teste LAMP não é necessário termociclador e o diagnóstico reside na detecção visual do produto amplificado, permitindo que o teste seja realizado em laboratórios locais (BOEHME *et al.*, 2007).

O teste Xpert realizado pelo Sistema Gene Xpert® MTB/RIF da Cepheid para diagnóstico *in vitro*, semi-quantitativo de Nested PCR em tempo real (qPCR) com detecção do DNA do Mtb e de mutações do gene *rpoB*, associadas à resistência à rifampicina para

identificação de cepas resistentes a fármacos. Permite a utilização de amostras de escarro obtidas por expectoração espontâneas ou induzidas, além de sedimentos concentrados de pessoas com suspeita clínica de TB pulmonar. Pacientes em tratamento para este agravo não foram contemplados tendo em vista que esta metodologia não foi validada para pesquisas nos pacientes em tratamento para TB (FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS, 2011; PERKINS, 2009).

O Sistema Xpert[®] MTB/RIF é uma plataforma que integra e automatiza os processos de preparação das amostras, purificação, concentração, amplificação e detecção de ácidos nucleicos do genoma do *M. tuberculosis*. Os resultados dos testes laboratoriais podem ser fornecidos em menos de 2 horas, sem necessidade de pessoal especializado em biologia molecular (FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS, 2011; VAN RIE *et al.*, 2010).

Na detecção simultânea do *M. tuberculosis* e da resistência à rifampicina cinco sondas estão sobrepostas e são complementares à região determinante da resistência à rifampicina, composta por 81 pares de bases do gene *rpoB*. Em seguida, esta região é examinada com o objetivo de identificar mutações associadas à resistência à rifampicina. O processo de amplificação por PCR, neste teste, é *heminested* e o alvo amplificado é detectado em tempo real por fluorescência (FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS, 2011).

Neste processo, dois conjuntos de *primers* são utilizados em duas reações sucessivas. Na primeira PCR, um par de *primers* é usado para gerar produtos de DNA, que podem conter produtos amplificados a partir de áreas não-alvo. Os produtos da primeira PCR são, então, usados como modelo em uma segunda PCR, usando um *primer* diferente, cujo sítio de ligação esteja localizado dentro do primeiro produto amplificado, consequentemente, aumentando a especificidade da reação (FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS, 2011; VAN RIE *et al.*, 2010).

Para a execução do teste, uma amostra de escarro é tratada com um reagente contendo hidróxido de sódio (NaOH) e isopropanol, o que reduz substancialmente os riscos biológicos, uma vez que diminui a viabilidade da *M. tuberculosis* por aproximadamente, pelo menos, seis *logs* (106 vezes o número de microrganismos viáveis). A amostra tratada é manualmente transferida para um cartucho de plástico de uso único, já pré-carregado com os elementos necessários para a reação, incluindo tampões e o reagente. O cartucho é inserido no instrumento que automaticamente conclui o processamento da amostra, a extração do DNA e a PCR *heminested* em tempo real (VAN RIE *et al.*, 2010).

Como o sistema integra e automatiza totalmente as etapas de extração da amostra, amplificação e detecção em um cartucho, não há necessidade de manipulação do fragmento e, desta forma, o risco de contaminação cruzada é substancialmente reduzido. Os resultados são gerados automaticamente na tela e relatados como *M. tuberculosis* negativos ou positivos, com estimativa semi-quantitativas da concentração relatada como baixa, média ou alta e sensível ou resistente à rifampicina. Um resultado positivo não necessariamente indica a presença de organismos viáveis, tendo em vista que a PCR identifica material genético de microrganismos vivos ou mortos (VAN RIE *et al.*, 2010).

Segundo a literatura, o Xpert pode ser realizado por técnicos sem qualificação específica, na ausência de uma infraestrutura de biocontenção, isto é, em configurações semelhantes aos laboratórios de diagnóstico de TB encontrados na maioria das regiões em desenvolvimento do mundo. O uso de cartuchos que podem ser carregados e processados individualmente, sem a necessidade de formação de lotes (FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS, 2011; VAN RIE *et al.*, 2010). A validação desse método foi realizada em cinco países, onde os resultados obtidos em três amostras por paciente demonstraram que o Xpert, em amostras negativas à baciloscopia, apresentou no diagnóstico de TB pulmonar, sensibilidade de 90,0%, e especificidade de 97,9%. Nos pacientes suspeitos de TB resistente, o Xpert apresentou sensibilidade de 96,1% e especificidade de 98,6% (PERKINS, 2009).

2.11 TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

Até a década de 1940, o tratamento da TB ainda era basicamente repouso e boa alimentação nos sanatórios. A descoberta estreptomicina em 1943 pelo bioquímico norte-americano Selman Abraham Waksman foi um marco histórico no tratamento da TB e lhe valeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1952. A partir de 1944, o uso desse antimicrobiano injetável, de ação bactericida, foi o primeiro tratamento efetivo contra o complexo *M. tuberculosis*, logo em seguida, no ano de 1945 foi comprovado o efeito bactericida do ácido para-amino salicílico contra o bacilo da TB (DANIEL, 2006; HIJJAR; PROCÓPIO, 2006).

O uso da estreptomicina por 24 meses no tratamento da TB apresentou resultados animadores logo no início do seu uso, entretanto, rapidamente, surgiram altas taxas de *Mtb* resistentes ao antibiótico e, no tratamento foi incluído o ácido para-amino salicílico em associação com a estreptomicina. Nas décadas seguintes surgiram novos fármacos como a isoniazida, primeiro bactericida oral disponibilizado, a partir de 1952 e a rifampicina em

1957. Somente nos anos da década de 1960 foi desenvolvido um esquema eficaz com a administração simultânea de três antibióticos, estreptomicina, isoniazida e ácido aminossalicílico, denominado esquema tríptico com a duração de 18 a 24 meses, instituído no Brasil pelo professor Hélio Fraga. Posteriormente foram introduzidas no esquema de tratamento da TB, novas drogas como a rifampicina, a pirazinamida e o etambutol iniciando um novo e promissor capítulo da história da TB que devido às elevadas taxas de cura e resultou na desativação dos sanatórios no final da década de 1970 (CONDE *et al.*, 2002; DANIEL, 2006).

Nos dias atuais, o tratamento com drogas de primeira linha tem duração de seis meses e utiliza a combinação de quatro drogas em esquema terapêutico que tem por finalidade evitar a resistência bacteriana (SOUZA, 2006).

2.12 RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS

A resistência aos fármacos é classificada com base no número de drogas que o *Mtb* não apresenta sensibilidade e pode ser: (i) monorresistência - quando o *M. tuberculosis* se apresenta resistente a um fármaco; (ii) multirresistência - quando simultaneamente é resistente, pelo menos, a rifampicina e isoniazida; (iii) polirresistência - quando a resistência ocorre com mais de um fármaco além da rifampicina e isoniazida e (iv) resistência extensiva aos fármacos - quando além da resistência à rifampicina e a isoniazida também é resistente a uma fluoroquinolona e a um medicamento injetável de segunda linha (BRASIL, 2011).

Os pacientes diagnosticados com cepas de *M. tuberculosis* resistente aos fármacos e seus familiares deverão ter atendimento realizado por equipe multiprofissional de saúde, capacitada em centros de referência, para garantir o cumprimento das normas de biossegurança. A equipe deve estar credenciada pelas coordenações municipais e estaduais de tuberculose para atuar nesses casos (BRASIL, 2011).

2.13 TUBERCULOSE EM POPULAÇÕES VULNERÁVEIS

Diversas situações contribuem para o desenvolvimento da TB, tais como: usuários de drogas (tabagismo e alcoolismo), indígenas, portadores de doença renal grave, diabetes, silicose, desnutrição, cânceres, transplantados, uso de corticosteroides, pessoas em tratamento para artrite reumatoide e doença de Crohn e as pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHIV), (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009). Outras situações

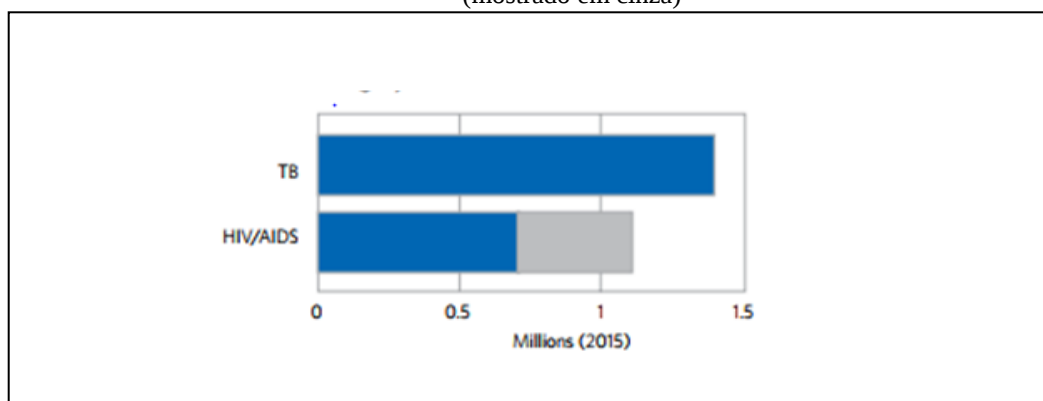
também causam maior vulnerabilidade como: pessoas vivendo em situação de rua, indivíduos em situação de confinamento como as pessoas privadas de liberdade (PPL), estudantes e profissionais da saúde (ROTH, *et al.*, 2005). Outros fatores importantes são: precárias condições de moradia e renda, baixa escolaridade e idade avançada (KOYANAGI *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2007; VENDRAMI *et al.*, 2005).

No Brasil, além desses grupos de indivíduos, destaca-se a população negra ou parda por viver em condição social desfavorável está submetida a duas vezes mais o risco de adoecer de TB que um branco. Outro grupo exposto ao risco são as pessoas vivendo nas favelas em situação de pobreza e extrema pobreza (CUEVAS, 2017).

2.13.1 Tuberculose em pessoas vivendo com HIV

A pandemia causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana - “*Human Immunodeficiency Virus*” (HIV) propiciou o crescimento dos casos de TB, modificou a epidemiologia da doença e dificultou o seu controle (SHARMA *et al.*, 2005). As populações com alta prevalência de PVHIV como na África Subsaariana, Ásia e América do Sul, pela sobreposição da coinfeção, a TB é uma das principais causas de morbimortalidade. Quase meio milhão de PVHIV morre anualmente por TB como está representado na Figura 13, que poderiam ser curadas com o uso de drogas específicas que estão globalmente disponíveis nos serviços de saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Figura 13- Estimativa do número de mortes por HIV/AIDS e TB em 2015
(mostrado em cinza)



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2016)

Legenda: a cor cinza = morte por TB/HIV

O início da terapia antirretroviral (TARV) reduz acentuadamente o risco de desenvolver TB, porém, muitos indivíduos em regiões de alta incidência de HIV desenvolvem

a TB ativa antes da iniciação do TARV. O sinergismo entre o Mtb e o HIV é bidirecional, pois, a TB acelera a evolução da infecção pelo HIV para a AIDS por mecanismos como a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que favorece a replicação viral com maior rapidez (HARRIES *et al.*, 2004). A infecção pelo HIV afeta os mecanismos da resposta imune mediada por células do hospedeiro por reduzir o número e comprometer as funções de linfócitos CD4 contribuindo para o aparecimento de formas graves da TB como a extrapulmonar e a miliar ou disseminada (GELDMACHER *et al.*, 2010). Nesses casos é necessário realizar procedimentos invasivos para coletar espécimes clínicos como líquido pleural, líquido e fragmentos de tecidos para biópsia de órgãos (BRASIL, 2011).

A infecção pelo HIV é o principal fator de reativação infecção latente por *M. tuberculosis* com progressão para a doença, bem como, aumenta o risco de reinfecção exógena e as taxas de mortalidade por TB. Nos imunossuprimidos a chance de desenvolver a TB é de 8% a 10% ao ano, enquanto que nos imunocompetentes essa chance é de 10% ao longo da vida (HARRIES *et al.*, 2004). A infecção pelo HIV/AIDS nos países endêmicos para TB aumentou o número de casos de TB pulmonar com baciloscopia negativa. Esses casos, apesar de transmitirem menos a TB, que os pacientes com baciloscopia positiva, devido ao imunocomprometimento e a sobrecarga de medicamentos antirretrovirais, apresentam mais reações adversas ao tratamento anti-TB e a taxa de mortalidade nesse grupo é mais elevada devido ao diagnóstico tardio da coinfeção. Os sinais e sintomas mais comuns de TB pulmonar em PVHIV são a perda de peso e febre, enquanto que a tosse e a hemoptise são menos frequentes que nos imunocompetentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004).

Segundo a OMS, a redução da coinfeção só será possível quando os sistemas de saúde puderem garantir aos portadores de TB o acesso ao diagnóstico do HIV e ao TARV, bem como, os indivíduos soropositivos tenham a garantia de realização do exame bacteriológico e do tratamento para TB preconizado pela OMS. A coleta de escarro em PVHIV para realização de exames bacteriológicos é muito importante na coinfeção por possibilitar a confirmação de TB ativa, realizar o diagnóstico diferencial com outros agravos e conhecer o perfil de sensibilidade às drogas anti-TB (BRASIL, 2008, 2011; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004).

No Brasil, 70% dos casos suspeitos de TB são informados da necessidade da testagem sorológica para o HIV, mas, apenas 50% tem acesso ao resultado e a positividade fica em torno de 15%. A taxa de mortalidade por TB em PVHIV é em torno de 20%, configurando a maior causa de morte por doença infecciosa nesse grupo.

A pesquisa de BAAR no escarro tem sido o pilar para triagem da TB, mas, apresenta baixo desempenho em pacientes imunocomprometidos devido a menor carga bacilar no escarro (LAWN; ZUMLA, 2011) e estima-se que a sensibilidade da baciloscopia em regiões com altas taxas de coinfeção pelo HIV é de aproximadamente 35% (CORBETT *et al.*, 2003). Em indivíduos infectados pelo HIV, geralmente as baciloscopias são negativas (ELLIOTT *et al.*, 1993). Em países com alta carga de TB, até 30% das PVHIV e com indicação de iniciarem TARV, também é portador de TB não diagnosticada por falta de uma investigação sistemática. Nas PVHIV, apenas o rastreio de sintomas de TB não chega a identificar 10-20% dos casos com cultura de escarro positiva (LAWN *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, estudos de validação internacional multicêntrico, validaram um novo teste rápido molecular, o Xpert, para diagnóstico da infecção pelo CMtb e resistência à rifampicina. Esse teste tem demonstrado boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de TB (BOEHME *et al.*, 2010, 2011). No entanto, o Xpert tem menor sensibilidade em amostras de escarro de pessoas com baciloscopia negativa, e entre 70% e 90% dos indivíduos que iniciam TARV tem a baciloscopia negativa (LAWN *et al.*, 2013). Além disso, os custos do Xpert representam uma barreira substancial e uma preocupação logística para o seu uso generalizado em regiões com recursos limitados (LAWN *et al.*, 2011).

2.13.2 Tuberculose em pessoas privadas de liberdade

A tuberculose em pessoas privadas de liberdade (PPL) se apresenta como um problema de grande magnitude, principalmente nas regiões com alta e média prevalência da doença (JITTIMANEE *et al.*, 2007; LAROUZÉ *et al.*, 2008). Por ser um mal social, a doença está intimamente vinculada às precárias condições socioeconômicas dos indivíduos antes do encarceramento. Atinge, na maioria das vezes, os jovens do sexo masculino com baixa escolaridade que consomem drogas lícitas e ilícitas e com maior prevalência de infecção por HIV, oriundos de comunidades com dificuldade de acesso aos serviços de saúde para diagnóstico e tratamento da TB (BRASIL, 2011).

No ambiente prisional, naturalmente violento e estressante, o confinamento em celas superlotadas mal ventiladas, com pouca iluminação solar e higiene inadequada, contribuem para a formação de alta carga de aerossóis contaminados com transmissão em massa da infecção entre os encarcerados. Nas PPL diagnosticadas com TB está aumentado o número de casos com formas resistentes e multidroga resistentes (MDR), geralmente relacionadas à

deteção tardia da infecção ou história anterior de abandono de tratamento (STUCKLER *et al.*, 2008).

No Brasil, o ambiente confinado das prisões é hiperendêmico para TB e segundo alguns estudos a prevalência de infecção chega a cerca de 65%, sendo prioritárias as ações para diagnóstico laboratorial com retorno do resultado do exame (geralmente, a baciloscopia direta) em 24 horas para início imediato do tratamento dos casos positivos (LE MOS *et al.*, 2009; SÁNCHEZ *et al.*, 2005; NOGUEIRA; ABRAHÃO, 2009).

A maioria dos países industrializados realiza sistematicamente os exames para detecção de TB no momento em que o detento ingressa no sistema prisional (AERTS *et al.*, 2006; BRASIL, 2006). No Brasil, a Resolução nº 11 do Conselho Nacional de Política Criminal e Penitenciária do Ministério da Justiça (CONSELHO NACIONAL DE POLITICA CRIMINAL E PENITENCIARIA, 2006) recomenda integrar essa prática ao exame de saúde admissional, conforme legislação nacional e internacional (GENERAL ASSEMBLY, UNITED NATIONS, 1988). Os exames devem ser realizados em até sete dias após o ingresso na unidade prisional e a busca ativa de casos deve ser realizada, no mínimo, uma vez ao ano em todos os indivíduos da mesma unidade prisional no menor espaço de tempo possível. A identificação de caso índice de TB em cela coletiva ou onde há permanência de grande número de pessoas em espaços comuns, todos devem ser considerados contato. O contato com teste positivo para HIV, mesmo que a TB ativa seja afastada, deve realizar a quimioprevenção recomendada para infecção latente pelo *M. tuberculosis* nos demais indivíduos (BRASIL, 2011).

O Ministério da Saúde orienta que as PPL com expectoração devem realizar a baciloscopia de escarro e o exame radiológico de tórax, sempre que possível. Os familiares e PPL com TB ativa devem ser orientados a procurar serviço de saúde para a caracterização do contato e realização dos exames preconizados para esse grupo de risco pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Sempre que houver alteração radiológica sugestiva de TB, a cultura de escarro deve ser realizada, independente do resultado da baciloscopia, pois, a detecção de casos com baciloscopia negativa é particularmente importante (BEHR *et al.*, 1999). Considerando a frequência presumidamente elevada de formas resistentes e MDR na população carcerária, o teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) deve ser realizado em todos os casos de TB com cultura positiva. O teste rápido para HIV deve ser oferecido de forma sistemática a todos as pessoas no momento da admissão no presídio, bem como, a todas as PPL já encarceradas que manifestem vontade de realizá-lo e deve ser sempre acompanhado de aconselhamento pré e pós-teste (BEHR *et al.*, 1999; BRASIL, 2009b).

O tratamento da TB para as PPL é o mesmo recomendado para a população geral (estratégia DOTS) realizada exclusivamente pelo profissional de saúde da unidade carcerária. É de grande relevância a realização de ações educativas a fim de informar, sensibilizar e promover o conhecimento sobre o diagnóstico e tratamento dos casos de TB em PPL, para que haja o engajamento e a proteção de todos contra a infecção (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

2.13.3 Tuberculose em pessoas vivendo em situação de rua

As pessoas vivendo em situação de rua formam outro grupo considerado pelo MS como de elevada vulnerabilidade para adoecimento por TB e configura como um grave problema de saúde pública pelas altas taxas de incidência e de abandono ao tratamento (BRASIL, 2011). Estudos realizados em três capitais do Brasil demonstraram incidências de TB entre 1.576 e 2.750/100 mil habitantes e mortalidade de 17.800/100 mil habitantes por TB nessa população e a alta taxa de abandono ao tratamento (CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA, 2007).

Segundo o MS as altas taxas de abandono estão relacionadas às questões como a baixa autoestima, desnutrição, uso do álcool e outras drogas e das comorbidades associadas. As doenças associadas mais frequentes foram cardiovasculares, transtornos mentais, dependência química e doenças sexualmente transmissíveis. O atendimento em centros de saúde geralmente é por demanda espontânea e o maior número de casos chega às urgências e emergências dos hospitais públicos com quadros de complicação inerentes à doença. Para enfrentamento do problema é necessário, melhoria no diagnóstico e tratamento dessa população com o envolvimento da rede de assistência à saúde estadual e municipal, dos Programas de Controle da TB municipais e de parceiros não governamentais (abrigos, albergues, centros de convivência) entre outros (BRASIL, 2011).

2.13.4 Tuberculose em populações indígenas do Brasil

A maioria dos povos indígenas brasileiros encontra-se na Amazônia Legal e vive em situação de pobreza. As habitações recebem pouca iluminação solar, são mal ventiladas e com grande número indivíduos por domicílio. Além disso, são altos os índices de desnutrição e parasitoses intestinais, esses fatores contribuem para que essa população tenha um risco de adoecimento por TB, três vezes maior que a população em geral (COSTA, 1987; NUTELS *et al.*, 1967). Estudos realizados entre os anos de 1990 e 2009 em várias etnias de diferentes

regiões do país revelaram altas incidências da doença comprovando a relevância sanitária da TB para os povos indígenas do Brasil (BÓIA *et al.*, 2009; BRASIL, 2011). Nos distritos prioritários, demonstrou-se que a incidência média de TB atingiu a cifra de 144,1 e 140,2/100 mil hab., nos anos de 2006 e 2007, respectivamente (SOUSA *et al.*, 1997). Em vista dessas especificidades, para o êxito das ações de controle da TB nas áreas indígenas devem-se levar em conta as questões éticas e peculiaridades inerentes a essa população especial para que as ações de prevenção, diagnóstico clínico, laboratorial e tratamento dos casos pela estratégia DOTS aconteçam de forma integrada entre os Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEI) com os Programas de Controle da Tuberculose municipais e estaduais (BRASIL, 2011).

2.13.5 Tuberculose em profissionais de saúde

Os profissionais e estudantes da área de saúde estão expostos ao maior risco de contraírem TB devido ao contato com pacientes bacilíferos e com materiais biológicos potencialmente infectados pelo *M. tuberculosis* (OLIVEIRA, 2011). Estudos sugerem que a vulnerabilidade entre as diversas categorias profissionais de saúde é diferente, pois, depende do tipo de atividade de cada indivíduo no conjunto de ações desenvolvidas na assistência direta ao paciente com TB ativa. O quadro 6 sintetiza as categorias profissionais de saúde com o percentual de risco de adoecimento quando comparados com a população geral (MALASKI *et al.*, 1990; MENZIES *et al.*, 1995; SEPKOWITZ *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2002).

O risco do profissional de saúde desenvolver TB é ainda maior quando em associação com alguma condição que afeta a resposta imunológica, entre as quais, destaca-se a infecção por HIV e receptores de órgão transplantado. No Brasil a Lei nº 8.213 de 24 de julho de 1991 permite incluir a TB como doença ocupacional e, quando ocorre em PS, deve ser notificada em formulário específico para Comunicação de Acidente de Trabalho (CAT). O diagnóstico da doença em profissionais de saúde é o mesmo da população geral e a infecção latente deve ser realizada nos exames admissionais e periódicos com prova tuberculínica. A prevenção primária consiste na adesão aos procedimentos de controle de infecção em Unidades de Saúde e a secundária, no tratamento da infecção latente nos recém-infectados que são diagnosticados pela viragem tuberculínica. A reativação da resposta tuberculínica (BCG ou infecção remota por *M. tuberculosis*) pelas células de memória denomina-se efeito *booster* e está presente em cerca de 6% dos profissionais de saúde. A definição do efeito *booster* se dá quando a segunda prova tuberculínica é maior ou igual a 10 milímetros, com incremento de pelo menos seis milímetros em relação à primeira prova tuberculínica. Nestes casos, não é indicado o

tratamento para infecção latente, pois, o risco de adoecimento é muito baixo (MENZIES, 1999; TRAJMAN *et al.*, 2009).

O Ministério da Saúde orienta que o profissional de saúde com sinais ou sintomas compatíveis com TB deve realizar consulta médica para investigação por exames laboratoriais, radiografia de tórax e deve permanecer afastado das suas atividades até que o caso seja descartado ou confirmado (BRASIL, 2011).

Quadro 6 - Risco de adoecimento por TB dos profissionais de saúde em comparação a população geral.

Profissionais de Saúde	Risco de adoecimento por TB
Equipe de enfermagem	3 a 20 vezes
Patologistas clínicos	6 a 11 vezes
Técnicos de laboratório de bacteriologia	2 a 9 vezes
Tisio-pneumologistas	6 vezes
Estudantes de Medicina, Enfermagem e Fisioterapia	4 a 8 vezes

Fonte: Brasil (2011)

2.14 ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA PARA MANUSEIO DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM LABORATÓRIO

As espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* pela virulência, estabilidade no meio ambiente e capacidade de transmissão por via respiratória apresenta alto risco individual para os humanos, sendo classificado como um microrganismo do grupo de risco III na Classificação de Risco dos Agentes Biológicos (BRASIL, 2010b, 2015).

O Mtb quando disseminado na comunidade e no meio ambiente, é facilmente transmitido de pessoa a pessoa e apesar de existir tratamento com antibióticos e medidas de prevenção, causa em torno de 1.8 milhões de morte por ano em todo o mundo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

No laboratório de microbiologia, a manipulação de materiais biológicos potencialmente infectados com o Mtb amplifica o risco de contaminação, principalmente, na realização de métodos que concentram os microrganismos como a cultura, testes de identificação bioquímica e de sensibilidade aos fármacos. Dentre os procedimentos

laboratoriais com maior formação de aerossóis é importante destacar a centrifugação, confecção do esfregaço para realização da baciloscopia, a amplificação e sonicação (BRASIL, 2008, 2010b; TEIXEIRA; BORBA, 2010).

Quanto maior o número de amostras biológicas de indivíduos com suspeita clínica de TB pulmonar e de culturas positivas manipuladas diariamente, maior será a formação de aerossóis e consequentemente maior o risco de infecção para os profissionais do laboratório. Portanto, é necessário que o gestor da unidade de saúde disponibilize ou implante um programa de biossegurança que contemple medidas administrativas e técnicas que minimizem os riscos de contaminação dos profissionais de laboratório. Além disso, a manipulação de meios de cultura com crescimento de micobactérias, exige boas práticas de laboratório e rigorosa observação dos procedimentos de biossegurança preconizados para manuseio de microrganismo da classe de risco 3 (BRASIL, 2008).

As normas de biossegurança a serem implantadas nos laboratórios que realizam bacteriologia da TB, devem levar em consideração o número de amostras biológicas positivas para BAAR, a complexidade dos exames realizados e os procedimentos formadores de aerossóis. A execução de uma baciloscopia não requer uma área de contenção com biossegurança de nível 3, e sim uma área com nível 2 de biossegurança, utilizando-se uma cabine de segurança biológica. Entretanto, atividades diagnósticas que exigem a reprodução do Mtb, expõem o profissional a maior concentração do agente biológico, requer que as atividades sejam conduzidas numa área de contenção nível 3 (BRASIL, 2010b).

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

Os métodos utilizados e os resultados estão apresentados em três artigos distintos alinhados aos objetivos propostos: Artigo 1 - avaliação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da tuberculose pulmonar; Artigo 2 - detecção de *mycobacterium tuberculosis* utilizando microscopia de esfregaço em escarro processado e Artigo 3 - acurácia da baciloscopia em amostras de escarro processadas por tratamento químico e sedimentação espontânea no diagnóstico da tuberculose em pessoas privadas de liberdade.

3.1 ARTIGO 1- AVALIAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR

Autores:

José Luiz de Oliveira Magalhães¹, Ana Albertina de Araújo², Leonardo Oliveira da Silva², Ilyana Oliveira Coutinho³, Juliana Figueiredo da Costa Lima³, Alzira Maria Paiva de Almeida¹, Nilma Cintra Leal¹

1. Instituto Aggeu Magalhães (IAM) - Fiocruz PE, Departamento de Microbiologia
2. Laboratório Municipal de Saúde Pública (LMSP) Recife-PE, Brasil
3. Instituto Aggeu Magalhães (IAM) Fiocruz PE, Departamento de Imunologia

Abstract

Pulmonary tuberculosis (PTB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is a serious public health problem that affects millions of people worldwide. The development of low-cost, easy-to-use diagnostic methods for use in hard-to-reach places and limited resources is necessary for better disease control. Our objective was to evaluate the accuracy of microscopy in sputum samples processed by chemical treatment and spontaneous sedimentation (PSS) in patients with clinical suspicion of PTB in comparison to the methods usually employed in the public and private network. The results were analyzed by the program SPSS 20.0 for Windows and Open Epi. Of 1,346 sputum samples analyzed, 16% were positive by PSS, 18% by culture and the rapid molecular (Xpert[®] MTB/RIF) assay (RMT) and 13% by conventional direct sputum smear (DS). Besides the greater accuracy in comparison to DS and to detect more positive cases PSS strengthens biosafety with the decrease of the risks of aerial contamination by Mtb in laboratory professionals. Therefore, in places with low income, where more advanced technologies are not available PSS represents an effective diagnostic tool.

Key words: Tuberculosis, Sputum smear, Culture, RMT-Xpert

Resumo

A tuberculose (TB) pulmonar, causada pelo *Micobacterium tuberculosis* (Mtb) é um grave problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas mundialmente. O desenvolvimento de métodos de diagnóstico de fácil execução e de baixo custo para uso em locais de difícil acesso e recursos limitados é necessário para melhor controle da doença. Nosso objetivo foi avaliar a acurácia da baciloscopia em amostras de escarro processadas por tratamento químico e sedimentação espontânea (BEP) em pacientes com suspeita clínica de TB pulmonar em comparação com os métodos usualmente empregados na rede pública e privada. Os resultados foram analisados pelo programa SPSS 20.0 for Windows e Open Epi. Do total de 1.346 amostras de escarro analisadas 16% foram positivas pela BEP, 18% pela cultura e Xpert e 13% pela BD. Além da maior acurácia em comparação à BD e detectar mais casos positivos a BEP fortalece a biossegurança com a diminuição dos riscos de contaminação aérea pelo *Mtb* nos profissionais de laboratório. Portanto, em locais com baixo poder econômico, onde tecnologias mais avançadas não estão disponíveis a BEP representa uma ferramenta diagnóstica eficaz.

Palavra chave: Tuberculose. Esfregaço de escarro. Cultura. TRM-Xpert

Introdução

A tuberculose (TB) pulmonar, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), vem afligindo os humanos há milênios e ainda afeta milhões de pessoas a cada ano sendo considerada uma das dez maiores causas de morte em todo o mundo¹.

A doença ocorre com maior frequência nos aglomerados urbanos com baixa condição socioeconômica e precárias condições sanitárias. Os investimentos para maior eficiência do diagnóstico e tratamento contribuíram para melhoria do panorama da doença, porém, a infecção continua como um grave problema de saúde pública mundialmente¹.

Nos países desenvolvidos, as taxas de morbidade e mortalidade por TB pulmonar apresentam tendência a declínio. Entretanto, onde há alta prevalência de infecção pelo HIV/AIDS (immunodeficiency vírus/acquired immunodeficiency syndrome), o número de casos novos e de óbitos vem aumentando¹.

A doença pode ser diagnosticada pela história clínica, exame radiológico, tomografia computadorizada do tórax, broncoscopia, prova tuberculínica ou reação de Mantoux, porém, o

diagnóstico conclusivo requer o isolamento e a identificação do agente infeccioso por exames laboratoriais como a baciloscopia direta (BD), a cultura e técnicas de biologia molecular¹.

A cultura, pela elevada sensibilidade é considerada o padrão-ouro nos estudos para avaliação da acurácia de outros métodos para diagnóstico da TB pulmonar. Conforme os padrões de qualidade na execução da técnica o limiar de detecção pode chegar a 10 bacilos/mL de escarro, mas, apresenta a desvantagem de ser uma metodologia complexa e de execução demorada, podendo chegar até oito semanas para obtenção do resultado, além de exigir instalações laboratoriais de maior nível de complexidade e condições de nível 3 de contenção (NB3) para manipulação do Mtb, microrganismo de classe de risco 3².

Os novos métodos de diagnóstico utilizando plataformas automáticas possuem alta sensibilidade e especificidade para detectar a presença do Mtb além de resistência bacteriana às drogas em amostras de escarro na TB pulmonar com suspeita de multirresistência ou pacientes co-infectados com HIV e fornecem os resultados rapidamente, em até 2 horas.

No Brasil, o sistema Gene Xpert[®] MTB/RIF (Xpert), através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose, está sendo utilizado em larga escala nos municípios com grandes rotinas bacteriológicas de diagnóstico da TB que compõem a Rede de Teste Rápido para Tuberculose (RTR-TB). A sensibilidade do teste é de 98% nos casos de TB pulmonar com baciloscopia positiva, enquanto que em amostras com baciloscopia negativa é em torno de 68% a 72%^{3,4}. Entretanto, esta plataforma ainda tem um custo elevado, sobretudo para ser utilizada em locais de recursos limitados.

A BD, pela simplicidade, rapidez e baixo custo, é o método mais largamente empregado para pesquisa do bacilo em pacientes com suspeita clínica de TB pulmonar, principalmente, nos lugares sem acesso a outros métodos de diagnóstico. Entretanto grande número de pacientes de TB pulmonar bacilífera são negativos na BD, principalmente os paucibacilares como crianças e co-infectados com HIV/AIDS. O limiar de detecção da BD é em média de 5.000 a 10.000 bacilos/mL de escarro. Conforme a qualidade e o número de amostras examinadas, além da expertise e persistência do microscopista a sensibilidade da BD pode chegar a 90%¹.

Diversos trabalhos foram realizados para aumentar a sensibilidade da BD com resultados variados, entre eles a baciloscopia após tratamento químico do escarro e a concentração dos bacilos por diferentes meios, mas os protocolos desenvolvidos não têm sido amplamente implementados nas rotinas diagnósticas^{5,6}.

Portanto é mandatório o desenvolvimento de metodologias mais acessíveis de fácil execução e de baixo custo para uso em locais de difícil acesso e recursos limitados.

Neste trabalho foi avaliada a acurácia da baciloscopia em amostras de escarro processadas por tratamento químico com NaOCl e sedimentação espontânea (BEP), em relação às provas usuais (Xpert, cultura e BD), em pacientes com suspeita clínica de TB pulmonar.

Materiais e Métodos

Tipo do estudo

Foi realizado um estudo transversal, prospectivo, para avaliação do desempenho da BEP em comparação com três métodos usuais de diagnóstico da TB pulmonar (Xpert, cultura e BD). Para o estudo foi selecionada uma amostra não probabilística, por conveniência, com escarros de sintomáticos respiratórios sem história pregressa de diagnóstico e de tratamento para TB e de pacientes com histórico de retratamento ou suspeita clínica de recidiva da infecção.

As amostras de escarro foram coletadas nas Unidades de Saúde e encaminhadas para o Laboratório Municipal de Saúde Pública (LMSP) da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura da cidade de Recife (Pernambuco Brasil) a fim de confirmação de suspeita clínica de TB pulmonar. As amostras foram inicialmente processadas no LMSP para análises pelo sistema Xpert e realização da cultura, em seguida foram mantidas sob refrigeração (4°C a 8°C) até serem transportadas em caixas térmicas com tampa, acondicionadas em saco plástico com símbolo de risco biológico para o Instituto Aggeu Magalhães (IAM - Fiocruz PE) para realização da BD e da BEP.

Análise pelo sistema Gene Xpert[®] MTB/RIF (Xpert)

O sistema Gene Xpert[®] MTB/RIF (desenvolvido pelo Cepheid Sunnyvale, CA, EUA), é um sistema integrado que automatiza os processos de purificação, concentração das amostras, amplificação e detecção de DNA do Mtb. O teste permite a utilização de amostras de escarro obtidas por expectoração espontânea ou induzida, de indivíduos com suspeita clínica de TB pulmonar. Os cartuchos podem ser carregados e processados individualmente (sem necessidade de formação de lotes), em combinação com a natureza modular do equipamento (módulos de 1, 4, 16 ou 48)^{7,8}. Emprega cinco sondas sobrepostas complementares à região da resistência à rifampicina, composta por 81 pares de bases do gene *rpoB* do Mtb^{9,10}. É um teste

semi-quantitativo, a amplificação por PCR é *heminested* (*nested*-PCR) a detecção do alvo amplificado ocorre por fluorescência em tempo real (qPCR) e permite detecção simultânea do Mtb e a resistência à rifampicina.

Na execução do teste Xpert, cada amostra de escarro é inicialmente tratada com um reagente contendo hidróxido de sódio (NaOH) e isopropanol (CH₃CHOHCH₃) para reduzir os riscos biológicos, uma vez que diminui a viabilidade do Mtb e transferida manualmente para um cartucho de plástico de uso único, já pré-carregado com os tampões e reagentes necessários a realização do teste. O cartucho é inserido no equipamento que automaticamente conclui as etapas do processamento da amostra, extração do DNA, amplificação e detecção com substancial redução do risco de contaminação cruzada. Os resultados são gerados automaticamente na tela como Mtb negativos ou positivos (com estimativa semi-quantitativa da concentração relatada como baixa média ou alta e sensível ou resistente à rifampicina). Um resultado positivo não necessariamente indica a presença de organismos viáveis ou unidades formadoras de colônias, tendo em vista que a PCR identifica DNA de microrganismos viáveis ou inviáveis.

Cultura pelo método Ogawa-Kudoh (OK)

Para o cultivo das amostras foi utilizado o meio Ogawa-Kudoh (OK) segundo procedimento usual¹¹. Para cada amostra um swab foi impregnado com a parte mais purulenta do escarro e em seguida introduzido num tubo estéril contendo 3 mL de solução de NaOH a 4%, por dois minutos para descontaminação e em seguida procedeu-se o semeio no meio de cultura OK com movimentos rotatórios do swab. As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C e observadas após 48 horas para verificação de crescimento bacteriano que nesta fase, é indicativo de contaminação.

As culturas foram observadas semanalmente por até 60 dias para verificar o crescimento de colônias com características do Mtb, velocidade de crescimento e aspecto morfológico. A identificação do Mtb foi confirmada pelas propriedades de álcool-ácido resistência, formação de fator corda, provas bioquímicas de niacina, catalase, nitrato-redutase, PNB (β -nitrobenzoic acid) e TCH (thiophene-2-carboxylic acid hydrazide) e antibiograma^{11,12}

Baciloscopia direta pelo método convencional (BD)

Em cabine de segurança biológica classe II B2, os escarros foram examinados macroscopicamente para identificação da porção mais densa ou purulenta, para retirada do material com auxílio de um palito de bambu e preparação do esfregaço em lâminas de vidro com extremidades foscas devidamente identificadas.

Os esfregaços, secos à temperatura ambiente (TA), foram fixados pelo calor em chama direta de lamparina à álcool e corados pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN). Após secagem, procedeu-se a leitura dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) no microscópio ótico (MO) em objetiva de imersão. Para a quantificação dos BAAR foi adotado o sistema de cruzeiros¹³: negativo (nenhum BAAR em 100 campos); 1-9 BAAR (1-9 BAAR em 100 campos); + (10-99 BAAR em 100 campos); ++ (1-10 BAAR em 50 campos); +++ (>10 BAAR em 20 campos).

Baciloscopia no escarro processado (BEP)

Após confecção do esfregaço para a BD convencional adicionou-se NaOCl comercial (água sanitária) na concentração de 2,0-2,5%, correspondente a duas vezes o volume de escarro restante no recipiente. O material foi homogeneizado por agitação em movimentos circulares para evitar vazamento, aguardou-se por aproximadamente 10 minutos para diminuição dos riscos de contaminação do operador, só após esse tempo foi realizada outra agitação e a transferência do material para um tubo cônico (Falcon) de 12 mL, com tampa rosqueável, identificado numericamente. O material foi novamente homogeneizado por agitação vigorosa para facilitar a dissolução da matéria orgânica seguido de repouso para sedimentação espontânea por 12 a 18 horas (*overnight*). O sobrenadante foi descartado e o sedimento depositado no fundo do tubo foi agitado para ressuspender os microrganismos na parte líquida restante. O precipitado foi vertido diretamente sobre a lâmina de vidro e, por movimentos circulares com a boca do próprio tubo preparou-se o esfregaço. A secagem dos esfregaços foi realizada a TA e as demais etapas seguiram o mesmo protocolo da BD convencional acima descrito com pequena modificação para evitar descolamento do material biológico da lâmina: coloração com a fucsina fenicada de Ziehl por 3 minutos, solução de álcool-ácido 30 segundos e coloração de fundo com o azul de metileno 30 segundos.

Análise estatística

Os resultados foram introduzidos num banco de dados construído no programa SPSS 20.0 *for Windows* e analisados pelo programa Open Epi¹⁴ e pelo próprio SPSS para calcular os dados da acurácia da metodologia em estudo (sensibilidade; especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo) e índice Kappa (K). As dependências das variáveis foram analisadas pelo teste Qui-quadrado e todas as conclusões tomadas ao nível de significância de 5%.

Aspectos éticos

O Projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz PE (CAAE 57175616.9.0000.5190) e teve a anuência das unidades de saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Recife, PE.

Resultados

As amostras de escarro foram analisadas por Xpert (n=1.346), cultura (n=1.332), BD e BEP (n=1.348). A diferença no total de amostras examinadas entre os métodos ocorreu devido à contaminação na cultura e foram excluídas do estudo de acurácia quando a cultura foi o padrão-ouro. A acurácia entre as diversas metodologias foi analisada estatisticamente. Os resultados são mostrados nas Tabelas 1, 2 e 3. A cultura foi considerada padrão-ouro para os cálculos estatísticos.

Houve crescimento do Mtb (culturas-positivas) em 18% (235/1.332) das amostras de escarro; pela BD 13% (171/1.332) das amostras foram positivas para BAAR; pela BEP 16% (213/1.332) das amostras foram positivas para BAAR e pelo Xpert 18% (234/1.332) foram positivas para Mtb (Tabela 1).

Comparação da BD com a cultura

Nas 235 amostras positivas na cultura, 73% (171/235) foram positivas e 27% (64/235) negativas para BAAR (falso-negativas) pela BD (Tabela 1). O percentual de positividade da BD foi de 13% em relação ao total de amostras examinadas.

Comparação da BEP com a cultura

Das 235 amostras positivas na cultura, 81% (191/235) foram positivas para BAAR e em 19% (44/235) não foram encontrados BAAR (falso-negativas) pela BEP. Por outro lado, 22 amostras negativas na cultura foram positivas pela BEP totalizando 213 amostras positivas, correspondente a uma positividade de 16% sobre as 1.332 amostras analisadas (Tabela 1).

Em relação aos resultados divergentes por cultura e BEP, observou-se que a cultura foi negativa em três de 12 amostras de escarros paucibacilares (1-9 BAAR /100 campos microscópicos) pela BEP, em 12 de 79 amostras positivas (+) na BEP e em sete de 73 amostras positivas (++). Houve concordância de 100% entre a cultura e a BEP em 71 escarros positivos (+++) (Tabela 2).

Comparação do Xpert com a cultura

Das 1.332 amostras analisadas por cultura e Xpert, 212 (16%) foram positivas e 1.066 (80%) foram negativas nos dois métodos; 22 amostras de cultura positiva foram negativas no Xpert e 32 amostras negativas na cultura foram positivas no Xpert. No total foram 234 amostras positivas por cultura e 244 amostras positivas no Xpert. Para os cálculos de acurácia, os resultados positivos no Xpert e negativos na cultura foram considerados falso-negativos.

Das 235 amostras com cultura positiva, uma foi eliminada neste estudo comparativo porque o teste pelo Xpert foi inconclusivo ficando 234 culturas para comparação.

Comparação da BD e BEP com o Xpert

Foram analisadas 1.346 amostras de escarro pelos três métodos, dessas, 255 (19 %) foram positivas pelo Xpert. Nove das 1.091 (0,008%) amostras negativas no Xpert foram positivas por BD e BEP. Entre as 255 amostras positivas no Xpert, a BEP teve 47 (18%) positivos a mais que a BD.

Comparação da BD com o Xpert

Nas 255 amostras positivas no Xpert 176 (69%) também foram positivas por BD e 79 (31%) foram resultados falso-negativos na BD.

Comparação da BEP com o Xpert

Nas 255 amostras positivas no Xpert, 223 (87%) amostras foram positivas por BEP e 32 (13%) falso-negativas.

Comparação dos resultados da BD e da BEP

Nas 1348 amostras examinadas pela BD e BEP, 186 (13,8%) foram positivas pela BD e 243 (18%) pela BEP. Houve concordância dos resultados negativos para BAAR em 1105 (82%) amostras. A BEP teve 57 amostras positivas a mais que a BD o que corresponde a um percentual de 31% no aumento de positividade.

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), intervalo de confiança (IC) e o índice de concordância (Kappa) entre os métodos com intervalo de confiança de 95% são mostrados na Tabela 3.

Discussão

O portador da TB pulmonar bacilífera é o mais importante disseminador da infecção na comunidade, logo, identificar e tratar esses pacientes é o primeiro passo no controle da doença, pois, interfere diretamente na transmissão dos bacilos entre os indivíduos¹⁵.

Os avanços tecnológicos têm disponibilizado testes rápidos automatizados para o diagnóstico laboratorial da TB pulmonar com alta sensibilidade, especificidade, rapidez e informações sobre resistência aos fármacos. No Brasil o sistema Xpert para detecção do Mtb e resistência à rifampicina está sendo implantado nos laboratórios de saúde pública em várias regiões. Entretanto esta tecnologia ainda é economicamente inviável em alguns serviços de atenção básica, pois, exige recursos financeiros elevados para adquirir equipamentos e reagentes importados. Além de exigir laboratórios mais estruturados, com fornecimento ininterrupto de energia elétrica estabilizada e no mínimo uma calibração anual por profissional treinado com equipamento especial. A falta de orçamento para custear a aquisição dos insumos nas regiões de baixo poder econômico poderá causar desabastecimento com perdas consideráveis no diagnóstico da doença^{8,16}.

A BD convencional mesmo sendo pouco sensível, pelas vantagens que apresenta, ainda é um importante método para detecção de TB pulmonar bacilífera, principalmente em países em desenvolvimento. A sensibilidade dessa técnica melhora consideravelmente se as amostras

biológicas estiverem no padrão de qualidade recomendado e forem executadas por profissionais devidamente capacitados. A fim de melhorar o desempenho da BD, diversos estudos têm sido realizados com o uso de produtos químicos, entre esses, o NaOCl em concentrações e tempos diferentes seguidos ou não por centrifugação ou sedimentação espontânea com resultados variáveis^{5,6}.

Neste trabalho, foi avaliada a baciloscopia em 1.331 amostras processadas de escarro (BEP) de sintomáticos respiratórios em comparação com a BD convencional, cultura e teste Xpert. Um total de 235 amostras (18.0%) foram positivas por cultura (verdadeiros positivos) e dessas a BD detectou BAAR em apenas 171 (73%) amostras. Dessa forma, um diagnóstico baseado somente na BD, 27% pacientes com TB bacilífera seriam categorizados como negativos para BAAR. Estimando-se que um portador pode transmitir a infecção para outros 10 a 15 indivíduos do seu contato direto no decorrer de um ano seriam mais de 600 pessoas com a infecção¹⁷.

Quanto aos resultados da BEP nos escarros positivos pela cultura, na maioria (81%) houve concordância no resultado positivo. Entretanto, a BEP identificou BAAR em 22 amostras negativas pela cultura. Apesar do percentual de detecção de BAAR ter sido inferior à cultura, o que já era esperado^{18,19}, a BEP detectou BAAR em 22 amostras negativas pela cultura. A discordância entre os resultados pode ter ocorrido na etapa de descontaminação do escarro. Nesta etapa o escarro é tratado com NaOH a 4% e a alcalinidade do produto torna os microrganismos inviáveis impossibilitando seu crescimento no meio de cultivo. Além disso, o método O-K utiliza um swab impregnado com pequena quantidade da amostra que após descontaminação é inoculada diretamente na superfície do meio, diferente do meio Lowenstein-Jensen que concentra bacilos em volume maior de amostra²⁰. Ou, esses escarros poderiam conter BAAR de outras espécies, por exemplo, *Micobacterium leprae*, que não cresce no meio específico para Mtb.

Quanto à negatividade da BEP em 44 amostras com culturas positivas, apesar de se esperar menor número de amostras positivas na baciloscopia em comparação a cultura, como os testes foram realizados no LMSP antes das BD e BPE. Portanto, não se afasta a possibilidade de que as porções das amostras mais ricas em bacilos tenham sido consumidas na realização da cultura e do Xpert. Consequentemente, negativando as baciloscopias. A positividade da BEP em comparação com a cultura foi 9% maior que a BD. Na análise de acurácia, ao acrescentar os 22 escarros positivos com culturas negativas, a BEP detectou BAAR em 213 amostras e o percentual de positividade no total de amostras examinadas (1.332) foi de 16%, muito próximo da cultura (18%).

Nas análises estatísticas para avaliação da acurácia da BD e da BEP em relação à cultura, os resultados revelaram melhor desempenho da cultura, mas também revelaram considerável aumento da positividade pela BEP comparada com a BD convencional.

Quanto à acurácia do Xpert frente à cultura houve discordância em 22 (9%) amostras com culturas positivas que foram negativas no Xpert. Em um estudo onde foram examinadas de um mesmo paciente três amostras de escarros positivos por BD e cultura, a sensibilidade do Xpert foi de 99% e pela análise de apenas uma amostra de cada paciente, a sensibilidade foi de 98%. Entretanto em escarros com BD negativa e cultura positiva a sensibilidade do Xpert foi de 73%²¹. Também podem ter sido visualizadas no microscópio, micobactérias não tuberculosas que apesar de terem as mesmas características morfológicas do complexo Mtb (CMtb) não são detectáveis pelo Xpert.

Em contrapartida, 32 escarros positivos no Xpert e negativos nas culturas para cálculo de acurácia foram considerados falso-negativos. Entretanto, essas amostras positivas no Xpert confirmam a presença de *M. tuberculosis* no escarro de modo que Xpert apresentou melhor acurácia que a cultura. Se considerarmos o Xpert como padrão-ouro, a sensibilidade da cultura pelo método O-K seria de aproximadamente 96%.

Nas análises de acurácia dos métodos avaliados (BD, BEP, Xpert e cultura), todos os resultados foram estatisticamente significantes comprovando que não foram aleatoriamente positivos ou negativos e confirmando que existe uma tendência para esses resultados. A sensibilidade, especificidade e concordância entre os testes foram satisfatórias e os índices Kappa acima de 50%.

A BD convencional foi o padrão de referência para os cálculos de acurácia da BEP e na avaliação de incremento, a BEP reproduziu todos os resultados positivos na BD. Ou seja, em nenhuma BD positiva, a BEP foi negativa, além disso, ainda teve um incremento de 57 amostras que foram negativas na BD e positivaram na BEP. De acordo com a literatura existente, a BEP, por concentrar os bacilos, aumenta consideravelmente a probabilidade das amostras serem positivas⁶.

Na comparação da BD e da BEP com o Xpert, houve tanto amostras negativas no Xpert e positivas na BEP quanto o contrário. Entre as 1.092 amostras negativas para Mtb no Xpert, em nove (0,06%) foram identificados BAAR pelas técnicas da BD convencional e BEP. Considerando que o Xpert é específico para a espécie do CMtb, nessas amostras poderiam estar presentes micobactérias não tuberculosas (MNT), que ao microscópio ótico exibem as mesmas propriedades morfológicas do Mtb^{7,22,23}.

Estudos anteriores sobre o tratamento do escarro com produtos químicos para melhorar a performance da BD chegaram a resultados bastante variados, porém, sempre com melhor desempenho do processado²⁴. Nosso estudo também comprovou que o tratamento prévio do escarro com NaOCl comercial aumentou em 9% a positividade das amostras com relação aos resultados obtidos somente com a BD. A técnica de BEP teve uma precisão diagnóstica, no total de amostras examinadas, muito próxima à cultura (16%/18%) e demonstra a sua importância na identificação de casos de TB pulmonar bacilífera não detectáveis pela BD convencional. Outra vantagem da BEP é o aumento da segurança para os profissionais de laboratório, uma vez que, o NaOCl em contato com os microrganismos presentes na amostra biológica, torna-os inviáveis e diminui os riscos de contaminação pela formação de aerossóis. A atuação do NaOCl na dissolução de material orgânico presente no escarro, favorece a precipitação espontânea dos bacilos mantendo intactas a morfologia e propriedades tintoriais da parede celular das micobactérias. O procedimento resulta num campo microscópico mais límpido facilitando a visualização dos bacilos. Como desvantagem, a digestão do escarro pelo NaOCl dificulta a fixação do material na lamina e favorece o desprendimento durante a coloração¹⁹. Para contornar o inconveniente da fragilidade do material para fixação em lâmina, o tempo nas etapas de coloração foi reduzido sem prejuízo da qualidade do resultado final da coloração.

Nesse contexto, a BEP, não só preserva as vantagens da BD como aumenta consideravelmente a identificação de BAAR em amostras biológicas inicialmente negativas pela BD. Devido à simplicidade do método, que dispensa o uso de centrifugadores, e à facilidade de acesso ao produto químico (de baixo custo e ser de uso comercial), é perfeitamente viável a sua implantação em laboratórios de unidades básicas de saúde. Nessas unidades, que não dispõem de outros métodos de diagnóstico, a implantação do BEP não implica, necessariamente, em mudanças estruturais ou investimentos elevados.

Em conclusão, a BEP com NaOCl comercial, tanto fortalece a biossegurança com a diminuição dos riscos de contaminação aérea pelo Mtb, como tem maior acurácia em comparação à BD, confirmando mais casos positivos. Por conseguinte, além do ganho considerável aos pacientes por iniciarem o tratamento precocemente, poderá reduzir a transmissão da infecção e favorecer as estratégias que visam o controle da doença. Portanto, em locais com baixo poder econômico, onde tecnologias mais avançadas não estão disponíveis, é recomendável implantar a BEP na rotina de diagnóstico.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório Municipal de Saúde Pública (LMSP) da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura do Recife/Pernambuco/Brasil, pelo fornecimento das amostras e a realização do diagnóstico por cultura e qPCR (Xpert). Ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM) da FIOCRUZ-PE pelo acesso ao Laboratório de biossegurança nível 2 (NB2) e fornecimento de insumos para a realização da baciloscopia, além dos itens de portação.

Referências

1. WHO-World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneve, 2016. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en
2. Centers for Disease Control and Prevention. National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. US Government Printing Office. Washington, 2009.
3. WHO-World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert® MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extra pulmonary TB in adults and children: police update. Geneva; 2013. Disponível em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0019/234352/EHNR-manual-ng.pdf
4. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília, DF; v. 46, n. 9, 2015. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/25/Boletim-tuberculose-2015.pdf>
5. Angeby KA, Alvarado-Gálvez C, Pineda-García L, Hoffner SE. Improved sputum microscopy for a more sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2000; 4:684-7.
6. Gebre N, Karlsson U, Jönsson G, Macaden R, Wolde A, Assefa A, et al. Improved microscopical diagnosis of pulmonary tuberculosis in developing countries. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89:191-3.
7. Blakemore R, Story E, Helb D, Kop JA, Banada P, Owens MR, et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert® MTB/RIF assay, J Clin Microbiol 2010; 48:2495-501.

8. FIND. Foundation for Innovative New Diagnostics. Frequently asked questions on Xpert® MTB/RIF assay. Geneva, 2011. Disponível em: <http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/media/press/pdf/Xpert_FAQs.pdf
9. Van Rie A¹, 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 Rev Mol Diagn.* 2010; 10:937-46.
10. Lawn SD, Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol.* 2011; 6:1067–82.
11. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília, DF. 2008. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb_3_9_10.pdf e <http://pesquisa.bvsalud.org/bvsmis/resource/pt/mis-19115>
12. OPAS/Organización Panamericana de La Salud. Manual para El Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guías técnicas. Parte II-Cultivo, 107p., 2008
13. Fitz-Gerald M (ed) The handbook global edition. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. 2013
14. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão 2010. Disponível em: www.OpenEpi.com
15. Sulis G, Roggi A, Matteelli A, Raviglione MC. Tuberculosis: epidemiology and control. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014;6(1): e2014070
16. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília, DF; v. 46, n. 9, 2015. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/25/Boletim-tuberculose-2015.pdf>
17. Fiuza de Mello FA, Afiune JB. Transmissão e Imunopatogenia da Tuberculose. *J. Bras. Pneumol.*, 1993;19:p.917-8.
18. Angeby KAK, Hoffner SE, Diwan VK. Should the ‘bleach microscopy method’ be recommended for improved case detection of tuberculosis? Literature review and key person analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8:806–15.
19. Lawson L, Yassin MA, Ramsay A, Olajide I, Thacher TD, Davies PD, et al. Microbiological validation of smear microscopy after sputum digestion with bleach; 1 step closer to a one-stop diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2006; 86:34-40.

20. Oliveira MSC, Lima CAM, Moura MMF. Análise do método Ogawa-Kudoh e comparação com o método Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein-Jensen para diagnóstico da tuberculose no estado de Rondônia. *Revista Pesquisa & Criação*, 2011; 10: 127-37.
21. Martire T. Diagnostico laboratorial da tuberculose na infância: métodos convencionais e métodos rápidos. *Pulmão*, RJ. 2009;Supl.1:S20-S27.
22. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et. al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*. 2010; 363:1005-15.
23. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al., Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol*. 2010;48:229–37.
24. Srikanth P, Kamesh S, Daley P. Bleach optimization of sputum smear microscopy for pulmonary tuberculosis. *Indian J Tuberc*. 2009; 56:174-84.

Tabela 1- Comparação dos resultados entre métodos: baciloscopia direta, baciloscopia do escarro processado, Xpert e cultura

Comparação dos métodos			
BD	Cultura		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	171	10	181
Negativo	64	1087	1151
Total	235	1097	1332
BEP	Cultura		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	213	22	235
Negativo	22	1075	1097
Total	235	1097	1332
Xpert	Cultura		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	212	32	244
Negativo	22	1066	1088
Total	234	1097	1331
BD	Xpert		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	176	9	185
Negativo	79	1082	1161
Total	255	1091	1346
BEP	Xpert		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	223	32	255
Negativo	19	1072	1091
Total	242	1104	1346
BEP	BD		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	186	57	243
Negativo	0	1105	1105
Total	186	1162	1348

BD: baciloscopia direta; BEP: baciloscopia do escarro processado;
Xpert: Teste Xpert MTB/RIF

Tabela 2- Avaliação quanto ao número de BAAR nas amostras do escarro processado e na cultura

BEP	Cultura		
	Positivo	Negativo	Total
1-9 BAAR	9	3	12
+	67	12	79
++	66	7	73
+++	71	0	71
Negativo	22	1075	1097
Total	235	1096	1332

BEP: baciloscopia do escarro processado; 1-9 BAAR: 1-9 BAAR/100 campos microscópicos (+): 10-99 BAAR/100 campos microscópicos; (++) : 1-10 BAAR/50 campos microscópicos; (+++): mais de 10 BAAR/20 campos microscópicos.

Tabela 3 - Avaliação da acurácia dos resultados das análises das amostras de escarro pelas técnicas, baciloscopia direta, baciloscopia do escarro processado, Xpert e cultura

Comparações	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Precisão	Kappa
BD x Cultura	73.0%	99.0%	95.0%	94.0%	94.0%	79.0% (p<0,001)
IC 95% (Inf-Sup)	(67.0-78.0)	(98.0-99.0)	(90.0-97.0)	(93.0-96.0)	(93.1-96.0)	
BEP x Cultura	91.0%	98.0%	91.0%	98.0%	97.0%	54.0% (p<0,001)
IC 95% (Inf-Sup)	(86.0-94.0)	(97.0-99.0)	(86.0-94.0)	(97.0-99.0)	(96.0-98.0)	
Xpert x Cultura	91.0%	97.0%	87.0%	98.0%	96.0%	86.0% (p<0,001)
IC 95% (Inf-Sup)	(86.0-94.0)	(96.0-98.0)	(82.0-91.0)	(97.0-99.0)	(95.0-97.0)	
BD x Xpert	69.0%	99.0%	95.0%	93.0%	93.0%	76.0% (p<0,001)
IC 95% (Inf-Sup)	(63.0-74.0)	(98.0-99.6)	(91.0-97.0)	(92.0-95.0)	(92.0-95.0)	
BEP x Xpert	97.0%	92.0%	98.0%	87.0%	96.0%	87.0% (p<0,001)
IC 95% (Inf-Sup)	(96.0-98.0)	(88.0-95.0)	(97.0-9.0)	(80.0-91.0)	(95.0-97.0)	
BD x BEP	100%	95%	76.5%	100%	96%	84.0% (p<0,001)
IC 95% (Inf-Sup)	(98.0-100)	(94.0-96.0)	(71.0-81.0)	(99.7-100)	(95.0-97.0)	

BD: baciloscopia direta; BEP: baciloscopia de escarro processado; Xpert: Teste Xpert MTB/RIF; VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo; IC: Intervalo de confiança; (Inf- Sup): Inferior-Superior.

3.2 ARTIGO 2 - *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MICROSCOPY DETECTION USING A PROCESSED SPUTUM SMEAR

Autores: José Luiz de Oliveira Magalhães¹, Ana Albertina de Araújo², Ilyana Oliveira Coutinho³, Juliana Figueiredo da Costa Lima³, Alzira Maria Paiva de Almeida¹, Nilma Cintra Leal¹

1. Instituto Aggeu Magalhães (IAM) - Fiocruz PE, Departamento de Microbiologia
2. Laboratório Municipal de Saúde Pública (LMSP) Recife-PE, Brasil
3. Instituto Aggeu Magalhães (IAM) Fiocruz PE, Departamento de Imunologia

Abstract

Introduction: Microscopy from a direct smear (DS) is widely used for active pulmonary tuberculosis detection but has limited sensitivity. We assessed the incremental yield of acid-fast bacilli (AFB) detection after microscopy on a processed sputum smear (PSS). **Methods:** Sputum samples were analyzed concurrently by DS and after processing the samples by chemical treatment and spontaneous sedimentation. **Results:** Of the 1,719 samples analyzed 16.4% were positive for AFB in conventional DS and 21.4% through PSS corresponding to a 30% increase in positivity. **Conclusions:** The increased biosafety and sensitivity of PSS will contribute to a better control of the disease.

Keywords: Tuberculosis. Sputum processed. Smear microscopy

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is one of the oldest human transmitted diseases. Pulmonary TB (PTB) transmission occurs by inhaling MTB-containing aerosols produced by a TB-infected person through coughing, sneezing or exhaling¹.

Identifying active pulmonary TB cases is crucial for reducing disease transmission and strengthening disease control. Sputum smear microscopy or direct smear (DS) screening for acid-fast bacilli (AFB) is the first-line test used for PTB laboratory diagnosis. A DS is easy to

perform, quick and inexpensive, but it has limited sensitivity, with a detection threshold of 5000 to 10000 AFB/ml of sputum².

Culture is the gold standard for diagnosis; it has a high sensitivity and detects up to 10 AFB/ml of sputum. However, it is laborious, complex and time-consuming, taking up to 12 weeks to provide results, and requiring complex laboratory facilities and containment level 3 (BSL3) conditions for handle the MTB organisms, which are hazard group 3 organisms^{2,3}.

A rapid test (Xpert MTB/RIF[®] assay) developed by Cepheid (Sunnyvale, CA, USA) based on real-time PCR (qPCR) allows, in up to two hours, the detection of MTB and the identification of mutations in the *rpoB* gene region that are associated with rifampicin resistance. Because this technology has a high cost, however, it is still underused and even inaccessible in some places².

Considering the importance of the microscopic detection of AFB for the PTB diagnosis, several modifications to the conventional sputum smear procedure were carried out, aiming to improve the sensitivity with varied results^{4,5}. The more prominent modifications included the concentration of the bacilli by sedimentation or centrifugation and the liquefaction of the samples or chemical treatment of the sputum using mainly bleach (2.0-2.5% commercial sodium hypochlorite – NaOCl). While the modifications served an important purpose, some of them did raise the laboratory biohazard considerably⁶.

Because MTB is so hazardous, there is a need, in public health services, for the implementation of effective, low-cost methodologies for identifying active PTB cases that are devoid of occupational hazard. This is especially true in remote and rural areas and in low income, high PTB burden regions. In this work, we assessed the incremental yield of AFB detection using a modified sputum smear microscopy protocol.

Single sputum samples from individuals with signs and symptoms of PTB were obtained from July 2015 to March 2016 at the Laboratório Municipal de Saúde Pública (LMSP - Recife, PE, Brasil). After the routine diagnosis analysis the samples were transferred to the Instituto Aggeu Magalhães (IAM) - Fiocruz PE. The samples were stored at +4 to 10°C for 6-7 days between the collection at LMSP and the analysis at the Biosafety Level 2 Laboratory (BSL2). At screening, only the samples ≥ 1 ml volume and of suitable consistency were enrolled for the study. The samples were analyzed concurrently by DS and after processing by chemical treatment with bleach and concentration by spontaneous overnight sedimentation. The difference between the two methods was tested using χ^2 ^{2,7}.

Direct smears (DS) were prepared directly from the patient samples prior to processing. In a biological safety cabinet (Class II-B2), the sputum samples were macroscopically

observed and the thicker mucous portions were picked with bamboo applicator sticks and thoroughly smeared on properly identified glass microscope slides. The smears were air-dried at room temperature (RT), heat-fixed using the flame of a spirit lamp and stained using the standard Ziehl-Neelsen (Z-N) method^{8,9}.

After the conventional smear was prepared, a volume of bleach that was twice the volume of sputum remaining in the container (1,33-1,66% final NaOCL concentration) was added and gently mixed to avoid spilling; the mixture was then left for approximately 10 minutes for inactivation of the MTB or other contaminating bacteria. The mixture was then poured directly into a properly identified 12 ml screw cap conical tube mixed thoroughly to improve the chemical digestion of the organic material and maintained at RT overnight (12 to 18 hours) for spontaneous sedimentation.

Next, the supernatant was discarded. The remaining deposit was vigorously mixed, the lid was discarded, and the open tube was placed facing backwards on the center of a glass slide and left until its material was completely drained onto the slide surface. The samples were then smeared over the slide using the mouth of the appropriate tube. The smears were air dried at RT, and the following steps were performed as described above for the DS except for the following minor modifications: fuchsin staining 3 minutes, alcohol-acid solution staining for 30 seconds, and methylene blue staining for 30 seconds.

The readings were carried out on a bright field microscope with a 100x oil objective lens, and the results were recorded based on the standard scoring scheme for AFB identification as follows: negative (no AFB observed in 100 fields); 1-9 AFB (1-9 AFB in 100 fields); 1+ (10-99 AFB in 100 fields); 2+ (1-10 AFB per field, after checking 50 fields); 3+ (more than 10 AFB per field after checking 20 fields)^{8,9}.

A total of 1,719 samples of sputum were enrolled in the study. Of these, 283 (16.5%) were positive, and 1,436 (83.5%) were negative for AFB by DS. Using PSS, 368 (21.4%) samples were positive, and 1351 (78.6%) were negative (Table 1).

There was concordance in the number of negative samples in the 1,351 samples using both procedures. Eighty-five negative sputum samples in conventional DS were positive for AFB in the PSS, corresponding to a 30% increase in positivity. This difference regarding the positivity percentage found between the two methods is statistically significant ($p < 0.001$)⁷.

Comparing the scores recorded in the two procedures, concordant results of the AFB counts were observed in 148 samples, and the number of AFB per microscopic field increased up to 10-fold in the 212 positives PSS from what it was in DS (Table 2).

Nineteen paucibacillary samples (1-9 AFB in 100 fields) by PSS were all negative by DS.

In 104 samples with 10-99 AFB in 100 fields (1+) per PSS, concordant results were observed in both procedures in 45 (43%) samples, which were also categorized 1+ by DS. Fifty-three (51%) samples were negative for DS. However, five (4.8%) samples showed a higher number of AFBs by DS. Among these exceptions, four samples were categorized 2+, and one sample was categorized 3+.

In 137 samples with 1-10 AFB in 50 fields (2+) per PSS, concordant results were observed in both procedures in 48 (35%) samples, which were also categorized 2+ by DS. Thirteen (9.5%) samples were negative by DS and 74 (54%) were categorized 1+. In two (1.4%) samples, the DS count was 3+.

The 108 samples with >10 AFB in 20 fields (3+) by PSS were also positive by DS. However, the AFB counts were concordant in both procedures in only 55 (51%) samples; 21 (19%) samples were only 1+, and 32 (30%) were 2+ by DS.

As for the positive results in the two procedures, the AFB count was concordant in 148 samples. However, in 212 samples, the number of AFB in the PSS was up to 10 times higher than in the conventional DS. This result means that there was considerable gain in the detection rate among the negative samples when using DS compared to using the PSS, mainly among the paucibacillary samples.

In addition to increasing the detection rate, PSS strengthens laboratory biosafety. The release of free chlorine by sodium hypochlorite inactivates the microorganisms present in the clinical sample. Furthermore, the NaOCl promotes the dissolution of particles from the sputum (mucus, saliva), favoring the spontaneous precipitation of the MTB bacilli, while maintaining the morphology and dyeing properties of the bacterial cell wall. The digestion of the particles from the sputum grants a cleaner microscopic field, which favors bacterial identification^{10,11}.

As a drawback, NaOCl digestion hampers the adherence of the smear to the slide, which can be easily washed away during staining¹². In our work, this problem was circumvented by decreasing the fuchsin staining time step for 3 minutes, without causing a bias to the staining results.

Another drawback of NaOCl treatment is that the time to obtaining results increased by 24 hours which is in discordance with TB control strategies². However, the procedure has the advantage of both the increased safety for the professionals and the increased sensitivity for the patients.

In conclusion, PSS is easy to perform, low-cost and allows AFB detection among conventional DS negative samples. When comparing the results of the AFB count using both procedures, the poorest yield was obtained by DS in the paucibacillary samples. The performance of the PSS was superior to the conventional DS; therefore, the procedure will be valuable for remote and rural areas in low-income, high TB-burden regions that lack automated diagnosis. The increased safety and sensitivity of MTB microscopic detection by processed sputum smears will contribute to improving the detection of active PTB cases and, consequently, better control of the disease.

Acknowledgements

We acknowledge to Leonardo Oliveira da Silva from the Laboratório Municipal de Saúde Pública da Prefeitura de Recife for providing the samples of sputum.

Ethical aspects

The research project was approved by the Ethics Committee of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEP-CPqAM) - Fiocruz PE (CAAE 57175616.9.0000.5190) with the consent of the Unidades de Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Recife, PE.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Sulis G, Roggi A, Matteelli A, Raviglione MC. Tuberculosis: Epidemiology and Control. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6:e2014070.
2. WHO. Global tuberculosis report 2016. WHO/HTM/TB/2016.13
3. Centers for Disease Control and Prevention. National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. US Government Printing Office. Washington, 2009.
4. Gebre N, Karlsson U, Jönsson G, Macaden R, Wolde A, Assefa A, et al. Improved microscopical diagnosis of pulmonary tuberculosis in developing countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89:191-3.

5. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(10):664-74.
6. Coelho AC, Díez JG. Biological risks and laboratory-acquired infections: a reality that cannot be ignored in health biotechnology. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:56. doi:10.3389/fbioe.2015.00056.
7. MedCalc Statistical Software version 17.9 (MedCalc Software bVbA, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>)
8. Fitz-Gerald M (ed) The handbook global edition. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. 2013.
9. Brasil - Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
10. Githui WA, Matu SW, Tunge N, Juma E. Biocidal effect of bleach on *Mycobacterium tuberculosis*: a safety measure. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11(7):798–802.
11. Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1990;28(10):2234-2239.
12. Lawson L, Yassin MA, Ramsay A, Olajide I, Thacher TD, Davies PD, et al. Microbiological validation of smear microscopy after sputum digestion with bleach; a step closer to a one-stop diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2006;86(1):34-40.

TABLE 1

Analysis of 1,719 sputum samples from individuals with signs and symptoms of PTB by direct smear and processed sputum smears

Procedure	Positive (%)*	Negative (%)
DS	283 (16,5)	1436 (83,5)
PSS	368 (21,4)	1351 (78,6)

DS: Direct smear of sputum; PSS: Processed sputum smear; (%): Percentage

*The difference of the positivity percentual is statistically significant ($p < 0.001$).

TABLE 2

AFB score in 1,719 sputum samples from individuals with signs and symptoms of PTB by direct smear (DS) and processed sputum smears (PSS)

DS						
PSS	Negative	1-9 AFB	1+	2+	3+	Total
Negative	1351	0	0	0	0	1351
1-9 AFB	19	0	0	0	0	19
1+	53	1	45	4	1	104
2+	13	0	74	48	2	137
3+	0	0	21	32	55	108
Total	1436	1	140	84	58	1719

DS: Direct smear of sputum; PSS: Processed sputum smear; AFB: acid-fast bacilli.

3.3 ARTIGO 3 – ACURÁCIA DA BACILOSCOPIA EM AMOSTRAS DE ESCARRO PROCESSADAS POR TRATAMENTO QUÍMICO E SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM PESSOAS PRIVADAS DE LIBERDADE

Autores: José Luiz de Oliveira Magalhães¹, Ana Albertina de Araújo², Leonardo Oliveira da Silva², Ilyana Oliveira Coutinho³, Juliana Figueiredo da Costa Lima³, Alzira Maria Paiva de Almeida¹, Nilma Cintra Leal¹

1. Instituto Aggeu Magalhães (IAM) - Fiocruz PE, Departamento de Microbiologia
2. Laboratório Municipal de Saúde Pública (LMSP) Recife-PE, Brasil
3. Instituto Aggeu Magalhães (IAM) Fiocruz PE, Departamento de Imunologia

Resumo

Objetivo: Desenvolver e avaliar um procedimento de fácil execução e baixo custo para incrementar o diagnóstico da tuberculose sem riscos de contaminação para profissionais de laboratório. **Métodos:** Foram analisadas 436 amostras de escarro por baciloscopia após tratamento com hipoclorito de sódio e sedimentação espontânea em comparação à baciloscopia convencional, cultura e sistema Xpert MTB/RIF. **Resultados:** A baciloscopia convencional identificou o *Mycobacterium tuberculosis* em 50/71 amostras positivas por cultura (verdadeiros positivos) e a do escarro processado em 67/71, o que corresponde a 94% de sensibilidade e incremento de 29% na positividade. **Conclusão:** O procedimento proposto preserva as vantagens e aumenta a sensibilidade da baciloscopia convencional. A implementação dessa técnica em locais de acesso limitado e com poucos recursos financeiros poderá aumentar a identificação de casos de tuberculose pulmonar.

Palavras-chave: Tuberculose, Escarro, *Mycobacterium tuberculosis*, Diagnóstico, Prisioneiros

Abstract

Objective: To develop and evaluate an easy-to-perform and low cost procedure to increase the diagnosis of tuberculosis without risk of contamination for laboratory professionals. **Methods:** A total of 436 sputum samples were analyzed after treatment with sodium hypochlorite and spontaneous sedimentation compared to conventional smear microscopy, culture and Xpert

MTB/RIF system. Results: Conventional microscopy identified *Mycobacterium tuberculosis* in 50/71 culture positive samples (gold standard) and processed sputum in 67/71, which corresponds to 94% sensitivity and 29% increase in positivity compared to the conventional microscopy. Conclusion: The proposed procedure preserves the advantages and increases the sensitivity of conventional microscopy. The implementation of this technique in places of limited access and with limited financial resources could increase the identification of pulmonary tuberculosis cases among the most vulnerable groups.

Keywords: Tuberculosis, Sputum, *Mycobacterium tuberculosis*, Diagnosis, Prisoners.

Introdução

A tuberculose é uma doença infecciosa, predominantemente pulmonar, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, mas, pode acometer outros tecidos e órgãos. Por ser de transmissão aérea o *M. tuberculosis* é facilmente disseminado em aglomeração de pessoas. O doente com tuberculose das vias respiratórias (pulmonar ou laríngea) expele os microrganismos em forma de aerossóis principalmente através da tosse. O portador bacilífero é a principal fonte de infecção, exigindo que, para o controle da doença, esses indivíduos sejam diagnosticados e tratados precocemente¹.

Um dos principais sintomas da tuberculose pulmonar é a tosse com expectoração às vezes sanguinolenta, mas, também podem ocorrer e devem ser investigados individualmente outros sinais e sintomas como febre vespertina, sudorese noturna, inapetência, emagrecimento rápido, cansaço e dificuldade para respirar².

Diagnosticar e tratar a tuberculose pulmonar bacilífera são importantes ações para o controle da doença, mas isto não tem sido atingido plenamente nos países que concentram o maior número de casos devido às fragilidades dos sistemas de saúde. Estima-se que, mundialmente, há 2 a 3 bilhões de infectados e desses, 5-15% vão desenvolver a tuberculose durante a vida³. Nos imunossuprimidos como as pessoas vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) a probabilidade de adoecimento aumenta 8 a 10% ao ano^{4,5}.

A tuberculose pulmonar é curável na maioria dos casos, mas, ainda persiste como um grave problema de saúde global, principalmente para os grupos mais vulneráveis. No Brasil, esses grupos são, as populações indígenas, as pessoas em situação de rua, e as pessoas privadas de liberdade pelas precárias condições de vida e os infectados pelo HIV⁴⁻⁶.

O risco de adoecimento e a mortalidade por tuberculose pulmonar nas populações carcerárias é maior que na população geral, principalmente quando associada com o HIV^{4,5,7}.

Para diminuir a transmissão da doença em prisioneiros, o Ministério da Saúde recomenda a implantação de ações para diagnóstico e tratamento de tuberculose nos presídios em todo território nacional, inclusive na admissão. A maioria das unidades prisionais brasileiras encaminha as amostras biológicas para diagnóstico nos laboratórios do Sistema Único de Saúde⁸.

O diagnóstico laboratorial da tuberculose é realizado comumente pela baciloscopia direta, pela cultura e na última década, vêm se destacando os testes moleculares rápidos automatizados. Entretanto, muitos casos são diagnosticados apenas por critérios clínicos sem confirmação bacteriológica. Esse tipo de triagem, por ser de baixa especificidade e sensibilidade, pode induzir a diagnósticos falso-positivos e consequente tratamento indevido ou falso-negativos levando a evolução de quadros mais graves por falta do tratamento³.

No Brasil, desde 2013, o Ministério da Saúde, pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose, vem implantando, em várias regiões, um teste molecular rápido, o Xpert MTB/RIF, para detecção do *M. tuberculosis* e resistência à rifampicina. No entanto, os laboratórios de saúde pública, em sua grande maioria, são estruturalmente inadequados para a implantação de metodologias mais complexas e onerosas^{9,10}. Portanto, apesar da grande importância da detecção de casos de tuberculose, ainda não existe uma ferramenta totalmente eficaz¹¹.

Assim, nosso objetivo foi desenvolver e avaliar um procedimento de fácil execução e baixo custo para incrementar o rendimento da baciloscopia direta convencional no diagnóstico da tuberculose pulmonar em pessoas privadas de liberdade, sem riscos de contaminação para os profissionais de laboratório.

Métodos

Estudo

Estudo transversal, prospectivo, para avaliação da acurácia da baciloscopia em amostras de escarro processado em comparação com três métodos usuais de diagnóstico da tuberculose pulmonar. Foi selecionada uma amostra não probabilística, por conveniência, de escarros de sintomáticos respiratórios sem história pregressa de diagnóstico e de tratamento para tuberculose ou com histórico de retratamento ou suspeita clínica de recidiva da infecção. As amostras foram provenientes do Laboratório Municipal de Saúde Pública da Prefeitura da Cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, obtidas de pessoas privadas de liberdade das unidades

prisionais situadas na Região Metropolitana do Recife, no período de julho/2015 a março/2016.

No Laboratório Municipal de Saúde Pública as amostras foram analisadas no Xpert[®] MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA) de acordo com o protocolo do fabricante e preconizado pelo Ministério da Saúde^{9,10} e em seguida processadas para cultura pelo método Ogawa-Kudoh (O-K) conforme descrito na literatura¹². Os recipientes com o restante das amostras de escarro foram encaminhados ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fiocruz, PE, para pesquisa de BAAR (bacilo álcool-ácido resistente) pela baciloscopia direta convencional e baciloscopia no escarro processado. A baciloscopia convencional foi realizada conforme procedimentos usuais¹².

Baciloscopia no escarro processado

Para realização da baciloscopia no escarro processado adicionou-se hipoclorito comercial a 2,0 a 2,5% em um volume correspondente a duas vezes o volume da amostra de escarro restante. O recipiente foi completamente rosqueado e agitado vigorosamente para deposição da amostra reduzida a um volume aproximado de apenas 1 mL e deixado em repouso por no mínimo 10 minutos à temperatura ambiente para inativação do *M. tuberculosis* e outras bactérias contaminantes e diminuir o risco de formação de aerossóis^{13,14}.

Em seguida, o material foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL com tampa rosqueável e novamente homogeneizado. Após repouso por 12 a 18 horas, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento utilizado para confecção do esfregaço. O tubo foi invertido sobre a lâmina até completo escoamento do sedimento que foi em seguida espalhado pela superfície da lâmina usando a própria boca do tubo. Após secagem do esfregaço à temperatura ambiente e fixação em chama direta realizou-se a coloração de Ziehl-Neelsen¹² com redução do tempo de coloração com a fucsina fenicada para três minutos. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio ótico com objetiva de imersão considerando resultados negativos quando nenhum BAAR era encontrado em 100 campos e positivos quando encontrados $\geq 1-9$ BAAR, em 100 campos^{3,8,12}.

Análise estatística

Os resultados foram introduzidos num banco de dados construído no programa SPSS 20.0 *for Windows*. Foi calculado a acurácia (sensibilidade, especificidade, valor preditivo

positivo, valor preditivo negativo e precisão) da metodologia em estudo pelo programa Open Epi¹⁵ e pelo próprio SPSS. Foram considerados padrão-ouro, a cultura e o teste molecular rápido. As dependências das variáveis foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado e todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz PE (CAAE-0022.0.095.000-11) e teve a anuência da Secretaria Municipal de Saúde de Recife, PE. Por questões éticas nenhum dado que pudesse identificar a fonte foi disponibilizado pelo Laboratório Municipal de Saúde Pública ao fornecer as amostras para o estudo.

Resultados

No estudo foram analisadas 436 amostras de escarro para avaliar a acurácia da baciloscopia em escarro processado pelo tratamento químico com hipoclorito comercial e sedimentação espontânea, em comparação com a baciloscopia convencional, a cultura e o teste molecular rápido. A sequência dos procedimentos realizados com as amostras está sumarizada no fluxograma (Figura 1).

O teste molecular rápido foi positivo em 18,6% (81/436), na cultura houve crescimento de *M. tuberculosis* em 16,3% (71/436) e sete (1,6%) revelaram-se contaminadas, a baciloscopia convencional foi positiva em apenas 12,6% (55/436) e a do escarro processado foi positiva em 16,3% (71/436) das amostras. Não foi observada resistência à rifampicina nas amostras positivas para *M. tuberculosis* pelo teste molecular rápido Xpert MTB/RIF.

A baciloscopia convencional identificou o *M. tuberculosis* em 50 das 71 amostras positivas por cultura (verdadeiros positivos) e a do escarro processado em 62 das 71, o que corresponde a uma sensibilidade de 87% e significa um incremento de 24% na positividade em comparação com a baciloscopia convencional (Tabelas 1 e 2).

A baciloscopia do escarro processado foi positiva em mais cinco amostras que foram negativas na baciloscopia convencional e na cultura, totalizando 67 amostras positivas, que corresponde à sensibilidade de 94% (67/71) e um incremento de 29%.

Na comparação do desempenho dos métodos avaliados em relação às 71 culturas positivas (considerados verdadeiros positivos), a sensibilidade da baciloscopia direta foi de 70%, da baciloscopia do escarro processado 87% e do teste molecular rápido 89% (Tabela 2).

Considerando a cultura como padrão-ouro, a sensibilidade da baciloscopia convencional foi 70%, na baciloscopia do escarro processado 87% e no teste molecular rápido 89%.

Tendo como padrão-ouro o teste molecular rápido, que é a técnica usada na rotina do Laboratório Municipal de Saúde Pública, na comparação com os demais métodos avaliados, a sensibilidade da baciloscopia direta foi 65%, da baciloscopia do escarro processado foi 84% e da cultura de 84% (Tabela 2).

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, intervalo de confiança e precisão entre os métodos com intervalo de confiança de 95% são mostrados na Tabela 2.

Nas análises de acurácia dos quatro métodos todos os resultados foram estatisticamente significantes comprovando que não foram aleatoriamente positivos ou negativos. A sensibilidade, especificidade e concordância entre os testes foram satisfatórias.

Discussão

Em uma amostra de 436 escarros provenientes de prisioneiros na cidade do Recife foi avaliada a acurácia da baciloscopia em escarro processado por tratamento químico com hipoclorito comercial e sedimentação espontânea em comparação com os testes usualmente empregados no Brasil para diagnóstico da tuberculose pulmonar.

As amostras utilizadas foram provenientes de uma população prioritariamente atingida pela tuberculose que se enquadra entre os grupos de maior vulnerabilidade, pelas precárias condições socioeconômicas e sanitárias com maior chance de adoecimento^{6,7}.

A grande magnitude da doença nessa população está ligada ao precário estado nutricional dos indivíduos, consumo de drogas (permitidas e ilícitas), doenças associadas como o HIV/AIDS e a assistência à saúde inexistente ou ineficiente. As condições desfavoráveis do ambiente prisional (celas com espaços insuficientes, superlotadas, sem iluminação natural e ventilação inadequada) potencializam a transmissão e agravamento da doença. Adicionalmente, o abandono do tratamento entre os prisioneiros é mais frequente que na população livre, o que favorece ao aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos⁴⁻⁷.

A demora em diagnosticar e tratar o doente favorece a disseminação do *M. tuberculosis* entre os encarcerados, trabalhadores dos presídios e familiares em visita. A diminuição da morbi-mortalidade por tuberculose pulmonar tanto na população geral como nos

encarceirados depende do diagnóstico e tratamento precoces para diminuir a transmissão aérea do bacilo entre os contatos/comunicantes⁶.

Entre os métodos laboratoriais a cultura é o padrão-ouro para avaliação da acurácia de outros métodos^{3,12}. Entretanto, é uma técnica laboriosa e, por concentrar os microrganismos, exige estrutura laboratorial complexa e maior nível de biossegurança¹⁶. Em adição, a liberação do resultado pode demorar até oito semanas, sendo inadequado para triagem de casos.

O teste molecular rápido, apesar do excelente desempenho, rapidez no diagnóstico e identificar a resistência à rifampicina⁹, exige laboratórios mais estruturados, com maior aporte financeiro para aquisição de equipamentos e insumos importados. Isso pode inviabilizar a sua implantação em regiões de difícil acesso e com baixo poder econômico. Portanto, no Brasil, na maioria dos laboratórios do SUS, a baciloscopia direta convencional permanece como única opção para diagnóstico da tuberculose pulmonar^{3,8}.

Para atender à necessidade de uma técnica, de fácil execução e de baixo custo e sem risco de acarretar contaminação para os profissionais de laboratório^{11,16}, foi por nós desenvolvido e avaliado, neste trabalho, um procedimento para incrementar o rendimento da baciloscopia direta convencional.

Analisando o desempenho dos métodos de baciloscopia direta, baciloscopia do escarro processado e o teste molecular rápido em comparação com a cultura (padrão-ouro), verificou-se que em 30% (21/71) das amostras positivas na cultura a baciloscopia direta foi falso-negativa, enquanto que pela baciloscopia do escarro processado o percentual de positividade foi 13% ou seja, um incremento de 24%.

Este estudo revelou melhor acurácia do teste molecular rápido em relação aos outros métodos (Tabelas 1 e 2). Entretanto, a baciloscopia do escarro processado usando um produto facilmente encontrado e de baixo custo, apesar de retardar a liberação do resultado em um dia quando comparado à baciloscopia direta, minimiza os riscos de contaminação dos profissionais de laboratório por inviabilizar os microrganismos presentes na amostra biológica¹⁷⁻¹⁹. Além disso, a baciloscopia do escarro processado proporcionou importante incremento aumentando 29% na positividade das amostras (67/71) em comparação com a baciloscopia convencional.

Pode-se conjecturar que se as análises forem realizadas logo após a coleta das amostras, antes de outras manipulações dos escarros, a detecção de casos positivos pela baciloscopia no escarro processado poderia ser mais alta.

Em conclusão, o processamento das amostras de escarro com hipoclorito e sedimentação espontânea, além de preservar as vantagens, aumenta a sensibilidade da baciloscopia convencional. Portanto, a implementação da baciloscopia no escarro processado em locais de acesso limitado e com poucos recursos financeiros poderá aumentar a identificação de casos de tuberculose pulmonar, entre os grupos mais vulneráveis.

Contribuição dos autores

Magalhães JLO, Lima JFC, Almeida AMP, Leal NC participaram do planejamento, análise e discussão dos resultados, redação e revisão do manuscrito. Magalhães JLO, Araújo AA, Silva LO, Coutinho IO, realizaram os experimento e revisaram o manuscrito.

Referências

1. Sulis G, Roggi A, Matteelli A, Raviglione MC. Tuberculosis: epidemiology and control. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014 Nov; 6(1): e2014070.
2. Delogu G; Sali M; Fadda G. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013Nov; 5(1): e2013070.
3. WHO. Global tuberculosis report 2016. WHO/HTM/TB/2016.13. World Health Organization, Geneve, 2016 Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en
4. Law SD; Wood R; Wilkinson RJ. Changing concepts of “Latent Tuberculosis Infection” in patients living with HIV infection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011 ago; Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/cdi/2011/980594/abs/>>.
5. Tiemersma EW, Van der Werf MJ, Borgdorff MW, Williams BG, Nagelkerke NJ. Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. *PLoS One*. 2011 Apr; 4;6(4):e17601.
6. Larouzé B, Ventura M, Sánchez A R, Diuana V. Tuberculose nos presídios brasileiros: entre a responsabilidade estatal e a dupla penalização dos detentos: *Cad. Saúde Pública*, 2015; 31(6): 1127-30.
7. Valença MS, Possuelo LG, Cezar-Vaz MR, da Silva PEA. Tuberculose em presídios brasileiros: uma revisão integrativa da literatura. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2016; 21(7): 2147-60.

8. Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb_3_9_10.pdf
9. FIND. Foundation for Innovative New Diagnostics. Frequently asked questions on Xpert®MTB/RIF assay. Geneva, 2011. Disponível em: <http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/media/press/pdf/Xpert_FAQs.pdf>.
10. BRATIS. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. XPERT®MTB/RIF no diagnóstico da tuberculose pulmonar. Ano VI Nº 16. Set. de 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/brats_16.pdf.
11. Trajman A, Menzies D. Active tuberculosis case finding-do we have the right tool? *Lancet Infect Dis*. 2016 Sep;16(9):986-7.
12. Fitz-Gerald M (ed) The handbook global edition. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. 2013.
13. Cambanis A, Ramsay A, Wirkom V, Tata E, Cuevas LE. Investing time in microscopy: an opportunity to optimise smear-based case detection of tuberculosis. *International Journal Tuberculosis Lung Disease*. 2007 Jan;11(1):40-5.
14. Steingart KR, Ramsay A, Pai M. Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Expert Review Anti-Infective Therapy*. 2007 Jun; 5(3):327-31.
15. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão 2013. www.OpenEpi.com
16. Coelho AC, Díez JG. Biological risks and laboratory-acquired infections: a reality that cannot be ignored in health biotechnology. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015 Apr; 28(3): 56.
17. Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Clinical of Microbiology*. 1990 Oct; 28(10): 2234–39.
18. Githui WA, Matu SW, Tunge N, Juma E. Biocidal effect of bleach on *Mycobacterium tuberculosis*: a safety measure. *International Journal Tuberculosis Lung Disease*. 2007;11(7):798–802.
19. Srikanth P, Kamesh S, Daley P. Bleach optimization of sputum smear microscopy for pulmonary tuberculosis. *Indian Journal Tuberculosis*. 2009 Oct; 56(4):174-84.

Tabela 1 - Resultados das análises das amostras de escarro pela baciloscopia do escarro processado, baciloscopia direta convencional, cultura e teste molecular rápido para diagnóstico de tuberculose pulmonar em pessoas privadas de liberdade.

BD	Cultura		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	50	1	51
Negativo	21	357	378
Total	71	358	429
BEP	Cultura		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	62	5	67
Negativo	9	353	362
Total	71	358	429
Xpert	Cultura		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	63	12	75
Negativo	8	346	354
Total	71	358	429
BD	Xpert		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	53	2	55
Negativo	28	353	381
Total	81	355	436
BEP	Xpert		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	68	3	71
Negativo	13	352	365
Total	81	355	436
Cultura	Xpert		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	63	8	71
Negativo	12	346	358
Total	75	354	429

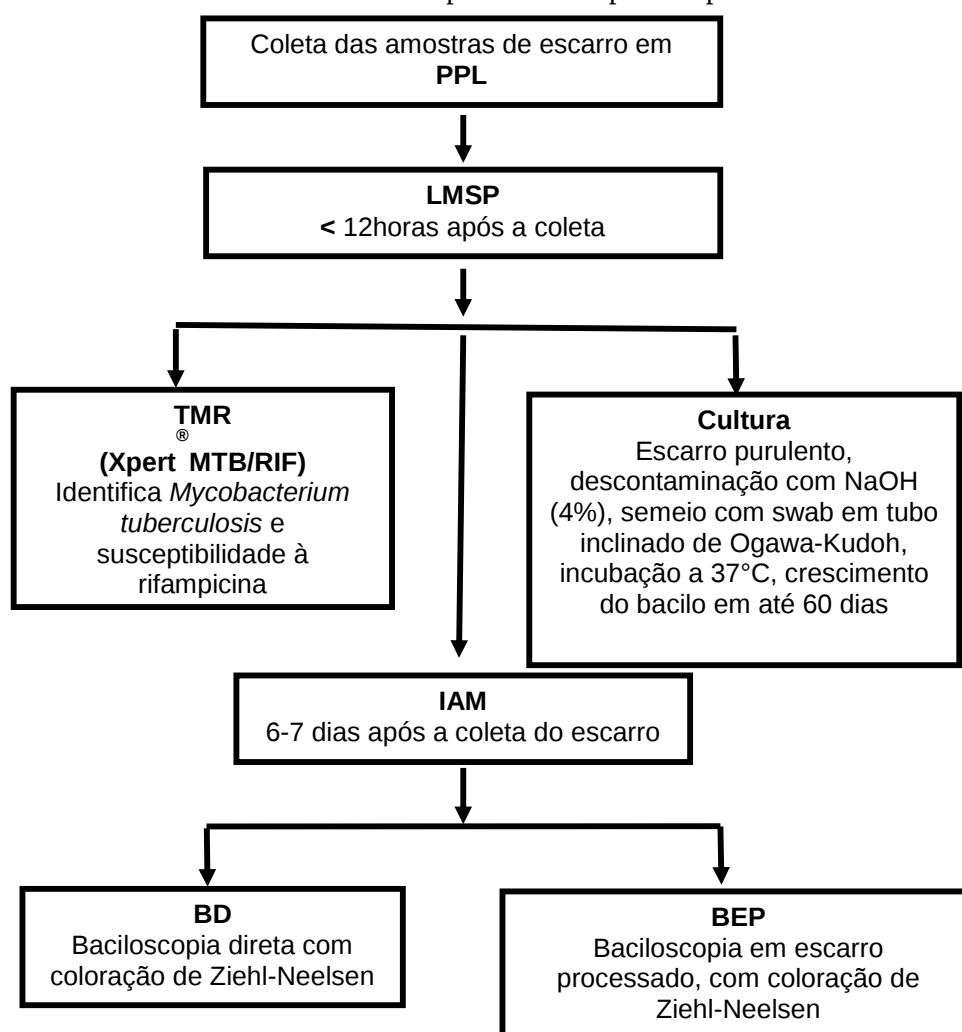
BD: baciloscopia direta convencional; BEP: baciloscopia do escarro processado

Tabela 2 - Avaliação da acurácia das análises das amostras de escarro pela baciloscopia do escarro processado, baciloscopia direta convencional, cultura e teste molecular rápido para diagnóstico de tuberculose pulmonar em pessoas privadas de liberdade.

Comparações	Sensibilidade %(IC-95%)	Especificidade %(IC-95%)	VPP %(IC-95%)	VPN %(IC-95%)	Precisão %(IC-95%)
BD x Cultura	70 (59-80)	99,7 (98-100)	98 (90-10)	94 (92-96)	95 (92-97)
BEP x Cultura	87 (78-93)	99 (97-99)	93(84-97)	98 (95-99)	97 (95-98)
TMR x Cultura	89 (79-94)	97 (94-98)	84 (74-90)	98 (96-99)	95 (93-97)
BD x TMR	65 (54-75)	99 (98-99,8)	96 (87-99)	93 (90-95)	93 (90-95)
BEP x TMR	84 (74-90)	99 (98-99)	96 (88-99)	96 (95-98)	96 (94-98)
Cultura x TMR	84 (74-91)	98 (96-99)	89 (79-94)	97 (94-98)	95 (93-97)

VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo; IC: intervalo de confiança; BD: baciloscopia direta convencional; BEP: baciloscopia do escarro processado; TMR: teste molecular rápido.

Figura 1 - Fluxograma adotado para as análises das amostras de escarro para diagnóstico de tuberculose pulmonar em pessoas privadas de liberdade.



4 CONCLUSÃO

Este estudo teve a finalidade de avaliar a acurácia da baciloscopia após modificações no método convencional, por adição de tratamento químico e sedimentação espontânea e comparar os resultados com os métodos usuais de diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Os resultados obtidos na cultura e no teste molecular rápido apresentaram maior acurácia na detecção de casos de TB pulmonar em conformidade com a literatura existente. Todavia, esses métodos ainda são inviáveis para implantação como rotina de diagnóstico na maioria dos países endêmicos para a doença. Para realização dessas técnicas é necessário que o laboratório disponha de infraestrutura adequada para manipulação de microrganismo de risco biológico classe 3, de recursos orçamentários que garantam o fornecimento ininterrupto de insumos e de profissionais capacitados.

A pesquisa de BAAR tradicional, universalmente utilizada como principal ferramenta de diagnóstico de TB pulmonar é um método que conhecidamente possui baixa sensibilidade e, como já era previsto, apresentou a menor acurácia entre os métodos avaliados.

Quanto ao método avaliado, os resultados da microscopia, após tratamento prévio das amostras de escarro com hipoclorito de sódio comercial (BEP), além do considerável incremento na positividade, detectou BAAR em amostras paucibacilares que positivaram apenas na cultura ou no teste molecular rápido (Xpert). Somam-se a isto, as vantagens de que a BEP utiliza insumos de baixo custo, com ampla distribuição no mercado, principalmente nas localidades com alta carga da doença. A realização do método não exige mudanças nas rotinas dos laboratórios, requer infraestrutura laboratorial simples, não gera sobrecarga de trabalho significativa e o treinamento do profissional é o mesmo necessário à realização da BD.

As dificuldades encontradas corroboram com as observadas em outros estudos, onde o NaOCl ao liquefazer o material orgânico do escarro, diminui a fixação da amostra biológica na superfície da lâmina de vidro e o esfregaço se desprende com muita facilidade nas etapas de lavagem durante o processo de coloração. A instabilidade do NaOCl, que ao ser adquirido em grande quantidade e as condições de armazenamento por longos períodos pode haver redução na concentração de cloro e prejudicar a realização da pesquisa de BK. Além disso, a sedimentação espontânea overnight por 18 a 24 horas poderá atrasar a liberação do resultado em um dia.

Podemos concluir que o método de concentração das amostras de escarro com NaOCl comercial preserva as vantagens da BD convencional, com aumento significativo na

identificação de casos de tuberculose pulmonar bacilífera, de forma eficaz, rápida, segura e com baixo custo, além de minimizar os riscos de contaminação dos profissionais de laboratório. Entretanto, as orientações do profissional de saúde para que o doente realize a coleta de escarro conforme os padrões de qualidade estabelecidos pela OMS são imprescindíveis, tendo em vista que amostras de escarro inadequadas dificilmente terá um resultado satisfatório.

Portanto, é recomendável a implantação dessa metodologia como método de triagem ou complementar à BD para diagnóstico da tuberculose pulmonar, tendo em vista que sua utilização aumenta a identificação de bacilos em maior número de amostras de escarro com resultados falso negativos na BD e, conseqüentemente, contribuirá para diminuir a transmissão da doença.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais.** 1998. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, London, v. 54, pt. 6, p. 2095-2105, 2004.
- AERTS, A. *et al.* Tuberculosis and tuberculosis control in European prisons. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 10, n. 11, p. 1215-1223, 2006.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Curso boas práticas.** Módulo 5-Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/etes_t2.htm>. Acesso em: 4 out. 2017.
- ALENCAR, F. *et al.* **História da Sociedade Brasileira.** 3. ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1985.
- ALEXANDER, K. A. *et al.* Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 16, n. 8, p. 1296-1299, 2010.
- ANTHONY, R. M. *et al.* Light emitting diodes for auramine O fluorescence microscopic screening of *Mycobacterium tuberculosis*. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 10, n. 9, p. 1060-1062, 2006.
- ANTUNES, J. L. F.; WALDMAN, E. A.; MORAES, M. A tuberculose através do século: ícones canônicos e signos do combate à enfermidade. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 367-379, 2000.
- ARANAZ, A. *et al.* Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 53, p. 1785-1789, 2003.
- ARIAS, M. *et al.* The microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay for detection of tuberculosis and tuberculosis drug resistance: results from a multi-center study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 5, p. 674-680, 2007.
- ATTORRI, S.; DUNBAR, S.; CLARRIDGE, J. E. Assessment of morphology for rapid presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 1426-1429, 2000.
- BARNARD, M. *et al.* Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 177, p. 787-792, 2008.

BARREIRA, D.; GRANGEIRO, A. Avaliação das estratégias de controle da tuberculose no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, supl. 1, p. 4-8, 2007.

BECTON DICKINSON. **Instruções de utilização de meios em placa prontos a usar**. Heidelberg, 2012.

BECTON DICSON. **BD BACTEC™ MGIT™ automated mycobacterial detection system**. Disponível em: <<https://www.bd.com/enus/offerings/capabilities/microbiology-solutions/mycobacteria-testing/bd-bactec-mgit-automated-mycobacterial-detection-system>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

BELCULFINÉ, D. C. Os sanatórios e seu tempo. **Pneumologia Paulista**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 68-70, 2009.

BEST, M. S. A. *et al.* Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, p. 2234-2239, 1990.

BLOOM, B. R. **Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control**. Washington, DC: American Society Microbiology, 1994.

BOEHME, C. C. *et al.* Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of pulmonary TB in microscopy centers of developing countries. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 1, n. 1, p. 1936-1940, 2007.

BOEHME, C. C. *et al.* Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 363, n. 11, p. 1005-1015, 2010.

BOEHME, C. C. *et al.* Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/ RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. **Lancet**, London, v. 377, n. 9776, p. 1495-1505, 2011.

BÓIA, M. N. *et al.* Tuberculose e parasitismo intestinal em população indígena na Amazônia brasileira. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.43, n.1, p.176-8. 2009.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, DF: Ministério da Saúde, v. 46, n. 9, 2015. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/25/Boletim-tuberculose-2015.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2016

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 47, n. 13, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/24/2016-009-Tuberculose-001.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 48, n. 8, 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/23/2017-V-48-N-8-Indicadores-priorit-rios-para-o-monitoramento-do-Plano-Nacional-pelo-Fim-da-Tuberculose-como-Problema-de-Sa-de-P-blica-no-Brasil.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

BONNET, M. *et al.* Bleach sedimentation: an opportunity to optimize smear microscopy for tuberculosis diagnosis in settings of high prevalence of HIV. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, p. 1710-1716, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Brasília, DF, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb_3_9_10.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7. ed. Brasília, DF, 2009a. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº151, de 14 de Outubro de 2009**. Aprova etapas sequenciadas e o Fluxograma Mínimo para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em indivíduos com idade acima de 18 (dezoito) meses, de uso obrigatório pelas instituições de saúde públicas e privadas. Brasília, DF, 2009b. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2009/prt0151_14_10_2009.html>. Acesso em: 5 ago. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília, DF, 2010a. Disponível em: <http://www.crfj.org.br/crf/arquivos/Manual_Recomendacoes_ControlTB.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos**. (Série A Normas e Manuais Técnicos); 3. ed. Brasília, DF, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom_pdf>. Acesso em: 28 out. 2016.

BRODIE, D.; SCHLUGER, N. W. The diagnosis of tuberculosis. **Clinics in Chest Medicine**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 247-271, 2005.

BWANGA, F. *et al.* Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis. **BMC Infectious Disease**, London, v. 9, p. 67, 2009. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-9-67>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

CAMBANIS, A. *et al.* Investing time in microscopy: an opportunity to optimise smear-based case detection of tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis Lung Disease**, Paris, v. 11, p. 40–45, 2007.

CAMPELO, C. L. *et al.* **Tuberculose**: diagnóstico laboratorial – baciloscopia. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 2001. (Série Telelab).

CAMPOS, R.; PIANITA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul-Brasil. **Boletim da Saúde**, Porto Alegre, v. 15, n. 1, p. 61-71, 2001.

CAPONE, D. *et al.* Diagnóstico por imagem da tuberculose. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 36-40, 2012.

CATTAMANCHI, A. *et al.* Does bleach processing increase the accuracy of sputum smear microscopy for diagnosing pulmonary tuberculosis? An updated systematic review and metanalysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 7, p. 2433-2439, 2010.

CATTAMANCHI, A. *et al.* Sensitivity of direct versus concentrated sputum smear microscopy in HIV-infected patients suspected of having pulmonary tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 9, p. 53, 2009. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-9-53>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). National Institutes of Health. **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)**. 5th ed. Washington, 2009. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). Department of Health & Human Services. **Mantoux**: tuberculin skin test. Washington, 2003. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/testing/skintesting.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2017.

CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3. ed. Rio de Janeiro: Fundação Nacional de Saúde, 2005. Edição comemorativa.

CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA (Brasil). Tuberculose. In: _____. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 1. ed. Brasília, DF, 2002.

CENTRO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA BRASIL. **2º Informe Técnico Sobre Vacinação/Revacinação BCG**. 1. ed. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 1994b.

COLE, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, London, v. 396, n. 6685, p. 537-544, June 1998. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Fredj_Tekaia/publication/13650817_deciphering_the_Biology_of_Mycobacterium_tuberculosis_from_the_Complete_Genomic_Sequence/links/0046351c41e2a84503000000.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2017.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Identification of species and variants of tubercle bacilli. In: **Organization and Practice in Tuberculosis Bacteriology**. Oxford: Butterworths, 1985. cap 8, p. 59-66.

CONDE, M. B. *et al.* III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

CONDE, M. B.; SOUZA, G. M.; KRITSKI, A. L. **Tuberculose sem medo**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

CONSELHO NACIONAL DE POLITICA CRIMINAL E PENITENCIARIA (Brasil). **Resolução nº11, de 7 de dezembro de 2006**. Recomenda a Diretriz Básica para Detecção de Casos de Tuberculose entre ingressos no Sistema Penitenciário nas Unidades da Federação. Brasília, DF, 2006b. Disponível em: <<http://www.justica.gov.br/seus-direitos/politica-penal/cnpcp-1/resolucoes/resolucoes-arquivos-pdf-de-1980-a-2015/resolucao-no-11-de-07-de-dezembro-de-2006.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

CORBETT, E. L. *et al.* The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. USA. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 163, p. 1009-1021, 2003.

COSTA, D. C. Política indigenista e assistência à saúde. Noel Nutels e o Serviço de Unidades Sanitárias Aéreas. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 388-401, 1987.

COUSINS, D. V. *et al.* Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1305-1314, 2003.

CUEVAS, L. **Tuberculose**: uma doença dos pobres. Brasília, DF, 8 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.sbmt.org.br/portal/tuberculose-uma-doenca-dos-pobres/>>. Acesso em: 20 out. 2017.

DALEY, P. *et al.* Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis: a systematic review. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 11, n. 11, p. 1166-1176, 2007.

DANIEL, T. M. The History of tuberculosis. Respiratory Medicine. **British Journal of Diseases of the Chest**, London, v. 100, p. 1862-1870, 2006.

DESJARDIN, L. E. *et al.* Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* mRNA as a surrogate for response to chemotherapy. **American Thoracic Society**, New York, v. 160, n. 1, p.203-210, 1999.

DINNES, J. *et al.* A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. **NIHR Journals Library**, Winchester, v. 11, n. 3, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0015157/pdf/PubMedHealth_PMH0015157.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2016.

DORRONSORO, I.; TORROBA, L. Microbiology of tuberculosis. **Revista Anales del Sistema Sanitário de Navarra**, Pamplona, v. 30, suppl. 2, p. 67-84, 2007.

DUBOS, R. J.; MIDDLEBROOK G. Media for tubercle bacilli. **American Review of Tuberculosis**, Baltimore, v. 56, p. 334-345, 1947.

DUCATI, R. G. *et al.* The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

DUNLAP, N. E. *et al.* Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. American Lung Association**, New York, v. 161, p. 1376-1395, 2000.

EAMRANNOND, P.; JARAMILLO, E. Tuberculosis in children: reassessing the need for improved diagnosis in global control strategies. **The International Journal Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 5, n. 7, p. 594-603, 2001.

ELLIOTT, A. M. *et al.* Negative sputum smears results in HIV-positive patients with pulmonary tuberculosis in Lusaka, Zambia. **Tuberculosis Lung Disease**, New York, v. 74, p. 191-194, 1993.

FENNELLY, K. P. *et al.* The small membrane filter method of microscopy to diagnose pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 6, p. 2096-2099, Jun. 2012.

FERREIRA, A. A. *et al.* Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 142-149, 2005.

FIUZA DE MELLO, F. A.; AFIUNE, J. B. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 917-918 1993.

FORRELLAD, M. A. *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex virulence. **Austin, Tex: Landes Bioscience, Philadelphia**, v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013.

FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS. **Frequently asked questions on Xpert MTB/RIF assay**. Geneva, 2011. Disponível em: <http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/media/press/pdf/Xpert_FAQs.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2016.

FREIRE, D. N.; BONAMETTI, A. M.; MATSUO, T. Diagnóstico precoce e progressão da tuberculose em contatos. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, DF, v.16, n. 3, p. 155-156, 2007.

FUJIKI, A. **AFB Microscopy training**. Tokyo: The Research Institute of Tuberculosis, 2005.

GAGNEUX, S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B - Biological Sciences**, London, v. 367, n. 1590, p. 850-859, 2012.

GANDI, E. M.; ZUMLA, A. The return of the white plague: global poverty and the new tuberculosis. **British Medical Journal**, London, v. 328, p. 1206, 2004.

GARG, S. K. *et al.* Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations, and possibilities. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 17, n. 5, p. 155-163, 2003.

GELDMACHER, C. *et al.* Preferential infection and depletion of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4 T cells after HIV-1 infection. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 207, n. 13, p. 2869-2881, 2010.

GENERAL ASSEMBLY, UNITED NATIONS. **Body of Principles for the Protection of All Persons under Any Form of Detention or Imprisonment**. New York: United Nations, 1988.

GIAMPAGLIA, C. M. S. *et al.* Multi-center evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *M. tuberculosis* as compared with BACTEC 460TB, Proportion and Resistance Ratio Methods in Southeast of Brazil. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**, San Francisco, v. 1, n. 9, p. 986-991, 2007.

GOMILA, M. *et al.* *Mycobacterium llatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, pt. 12, p. 2769-2973, 2008.

GRIFFITHS, G. *et al.* Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 827-829, 2010.

GUEDES, G. M. R. **Avaliação dos testes Quanti-FERON-TB GOLD e Nested PCR em único tubo no diagnóstico de tuberculose em pacientes imunodeprimidos**. 2013. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HARRIES, A. D. *et al.* **TB/HIV: a clinical manual**. 2. ed. Geneve: World Health Organization, 2004. v. 1, 210 p. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/>>. Acesso em: 15 maio 2016.

HERSHKOVITZ, I. *et al.* Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a neolithic settlement in the eastern mediterranean. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, n. 10, p. e3426, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003426>>. Acesso em: 15 maio 2016.

HIJJAR, M. A.; PROCÓPIO, M. J. Tuberculose – epidemiologia e controle no Brasil. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 15-23, 2006.

HUEBNER, R. E. *et al.* The tuberculin skin test. the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 17, p. 968-975, 1993.

INDRIGO, J.; HUNTER, R. L. Jr.; ACTOR, J. K. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. **Microbiology, American Institute of Biological Sciences**, Washington, v. 149, pt. 8, p. 2049-2059, 2003.

JEONG, Y. J., LEE, K. S. Pulmonary tuberculosis: up-to-date imaging and management. **AJR American Journal Roentgenol**, Leesburg, v. 191, n. 3, p. 834-844, Sep. 2008.

JITTIMANEE, S. X. *et al.* A prevalence survey for smear-positive tuberculosis in Thai prisons. **The International Journal Tuberculosis Lung Disease**, Paris, v. 11, p. 556-561, 2007.

KALANTRI, S. *et al.* Bacteriophage - based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta- analysis. **BioMed Central Infectious Disease**, London, v. 5, n. 1, p. 59, 2005.

KENT, P.T.; KUBICA, G. P. **Public Health Mycobacteriology: A Guide for Level III Laboratory**. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985. (Publication. n. PB86-216546).

KINYOUN, J. J. A note uhlenhuths method for sputum examination, for tubercle bacilli. **American Journal of Public Health**, New York, v. 5, n. 9, p.867-870, Sep. 1915.

KOYANAGI, A. *et al.* Relationships between sérum concentrations of C-reactive protein and micronutrients, in patients with tuberculosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 98, n. 4, p. 391-399, 2004.

KRITSKI, A. Emergência de tuberculose resistente: renovado desafio. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Rio de Janeiro, v. 36. n. 2, p. 157-158, 2010.

KRITSKI, A. L. *et al.* Duas décadas de pesquisa da tuberculose no Brasil: o estado da arte das publicações científicas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, n. 41, Supl.1, p. 10, 2007b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-89102007000800003&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 18 maio 2016.

KRITSKI, A. L.; FIUZA DE MELLO, F. A. Tuberculosis in adults. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Ed.). **Tuberculosis 2007: from basic science to patient care**. [S. l.]: Bourcillierkamps, 2007. cap. 15, p. 487-524.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; SOUZA, G. R. M. **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

KUBICA, G. P.; DYE, W. E. **Laboratory methods for clinical and public health mycobacteriology** Washington: U.S. Government Printing Office, 1967. (PHS Publication, n. 1547).

KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. Bull. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 51, p. 71-82, 1974.

LANGE, C., MORI, T. Advances in the Diagnosis of Tuberculosis. **Respirology**, Carlton, v. 15, n. 2, p. 220-240, Feb. 2010.

LAROUZÉ, B. *et al.* Tuberculosis behind bars in developing countries: a hidden shame to public health. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 9, p. 841-842, 2008.

LAWN, S. D. *et al.* Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. **The Lancet Infectious Disease**, New York, v. 13, n. 4, p. 349–361, 2013.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. Tuberculosis. **Lancet**, London, v. 378, n. 9785, p. 57-72, Jul. 2011.

LAWSON, L. *et al.* Microbiological validation of smear microscopy after sputum digestion with bleach; a step closer to a one-stop diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**, Montevideo, v. 86, n.1, p. 34-40, 2006.

LEMOS, A. C. *et al.* Prevalence of active and latent tuberculosis among inmates in a prison hospital in Bahia, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 35, p. 63-68, 2009.

LIANG, Q. L. *et al.* Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: A meta-analysis. **British Journal of Disease Respiratory Medicine**, London, v. 102, n. 5, p. 744-754, 2008.

LIMA, J. F. C. **Detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue e urina por meio da Nested-PCR em único tubo.** 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

LING, D. I. *et al.* Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. **PLoS One**, San Francisco, v. 2, p. e1536, 2008.

LOREDO, C. *et al.* **Tuberculosis.** Jueves, 2012. Disponível em: <<http://bacteriologiaequipo1.blogspot.com.br/2012/04/>>. Acesso em: 16 nov.2017

MALASKI, C. *et al.* Occupational tuberculosis infections among pulmonary physicians in training. **American Review Respiratory Disease**, Washington, v. 142, p. 505-507, 1990.

MARTIRE, T. M. Diagnóstico laboratorial da tuberculose na infância: métodos convencionais e métodos rápidos. **Pulmão**, Rio de Janeiro, supl. 1, p. 20-27, 2009.

MAZUREK, G. H.; VILLARINO M. E. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. MMWR Recommend. **Centers for Disease Control and Prevention**, Atlanta, v. 52, n. RR2, p. 15–18, 2003.

MELO, F. A. F.; AFIUNE, B. J.; MACEDO, L. G. Características da tuberculose pulmonar num serviço de referência antes e após a implantação do Sistema único de Saúde. **Jornal de Pneumologia**, Brasília, DF, v. 18, supl, p. 122, 1992.

MENZIES, D. *et al.* Thinking in three dimensions: a web-based algorithm to aid the interpretation of tuberculin skin test results. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**, Paris, v. 12, n. 5, p. 498-505, 2008.

MENZIES, D. *et al.* Tuberculosis among health care workers. Massachusetts Medical Society. **The New England Journal of Medicine**; Boston, v. 332, p. 92-98, 1995.

MENZIES, D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 159, n. 1, p. 15-21, 1999.

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M. L. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. **American Journal of Public Health and the Nation's Health**, New York, v. 48, p. 844-853, 1958.

MILLER, A. R. *et al.* Portable, battery-operated, low-cost, bright field and fluorescence microscope. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. e11890, 2010.

MIÖRNER, H. *et al.* Improved sensitivity of direct microscopy for acid-fast bacilli: sedimentation as an alternative to centrifugation for concentration of tubercle bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 84, p. 3206-3207, 1996.

MORITZ, P. *et al.* Determinação do componente inflamatório das doenças das vias aéreas através do escarro induzido: utilização na prática clínica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 34, n. 11, p. 913-921, nov. 2008.

MORRIS, A. J.; RELLER, L.B. Reliability of cord formation in BACTEC media for presumptive identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 9, p. 2533-2534, 1993.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NASCIMENTO, D. R. **As pestes do século XX: tuberculose e AIDS no Brasil, uma história comparada**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.

NAVIN, T. R.; MCNABB, S. J.; CRAWFORD, J. T. The continued threat of tuberculosis. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 8, n. 11, p. 1187, 2002.

NOGUEIRA, P. A.; ABRAHÃO, R.M.C.M. A infecção tuberculosa e o tempo de prisão da população carcerária dos Distritos Policiais da zona oeste da cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 1230-1238, 2009.

NORBIS, L. *et al.* Tuberculosis: lights and shadows in the current diagnostic landscape. **The New Microbiologica**, Pavia, v. 36, n. 2, p. 111-120, 2013.

NUTELS, N. *et al.* Tuberculin reaction, x-ray and bacteriological studies in the cayapó indians of Brazil. **Tubercle**, London, v. 48, p. 195-200, 1967.

OLIVEIRA, M. S. C. *et al.* Análise do método ogawa-kudoh e comparação com o método Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein-Jensen para diagnóstico da tuberculose no estado de Rondônia. **Revista Pesquisa & Criação**, Porto Velho, v. 10, n. 2, p. 127-137, jul./dez. 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Tuberculosis Research Office. TST reaction size on five consecutive days. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 12, p. 189, 1955.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Laboratory Services in tuberculosis control**. Part III: Culture. Geneva, 1998. (WHO/TB/98.258).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **TB/HIV: a clinical manual**. Geneva, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The Stop TB Strategy**: building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. Geneva, 2006a. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69241/1/WHO_HTM_STB_2006.368_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 19 out. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The Stop TB Strategy**: building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. Geneva, 2006b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Tuberculosis Control**: Epidemiology, Strategy, Financing. WHO report. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf>. Acesso em: 20 set. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Tuberculosis Control**. Geneva, 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44728/1/9789241564380_eng.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Tuberculosis Reporter**. Geneva, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_main.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2017

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global tuberculosis Report 2015**. 20th ed. Geneva, 2015 Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 28 out. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Tuberculosis Report 2016**. Geneva, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en>. Acesso em: 20 ago. 2017.

PADMA, S.; KAMESH, S.; DALEY, P. Bleach optimization of sputum smear microscopy for pulmonar tuberculosis. **The Indian Journal of Tuberculosis**, New Dehli, v. 56, p. 174-184, 2009.

PAI, M. *et al.* Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **The Lancet Infectious Disease**, New York, v. 4, p. 761–776, 2004a.

PAI, M. *et al.* Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Disease**, London, v. 4, p. 6, 2004b.

PAI, M. *et al.* Bacteriophage-based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis. **Journal of Infectology**, New York, v. 51, n. 3, p. 175-187, 2005.

PAI, M. *et al.* Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. **American Society of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 149, n. 3, p. 177-184, 2008.

PALHARES, M. C. A. *et al.* Baciloscopia após concentração com hipoclorito de sódio: um método específico e preditivo para o diagnóstico de tuberculose pulmonar em pacientes portadores de HIV/Aids. **Jornal Brasileiro de Patologia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 98-102, 1996.

PALOMINO, J. C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 26, n. 2, p. 339 – 350, 2005.

PALOMINO, J. C. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 102-111, 2009.

PANDEY, A. K. *et al.* NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, p. e1000500, 2009.

PANTEIX, G. *et al.* Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 59, pt. 8, p. 984-989, 2010.

PARDO, R. B. *et al.* Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

PARTNERS HEALTHCARE. **Tuberculosis**. Disponível em: <<http://www.idimages.org/login.aspx?ReturnUrl=%2fimages%2fdetail%2f%3fimageid%3d155&imageid=155>>. Acesso em: 20 abr. 2016.

PEDRO, H. S. *et al.* Avaliação do desempenho dos meios de cultura Ogawa-Kudoh e MGITT para isolamento de micobactérias. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 8, n. 91, p. 5-13, jul. 2011. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180642722011000700002&lng=pt>. Acesso em: 5 nov. 2017.

PERKINS, M. **Diagnostics Research and Development**. Geneva: World Health Organization, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2009.

PERKINS, M. D.; CUNNINGHAM, J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 196, Suppl. 1, p. S15-27, 2007.

PETERSEN, E. *et al.* World TB Day 2017: advances, challenges and opportunities in the “End-TB” Era, **International Journal of Infectious Disease**, Hamilton, v. 56, p. 1-5, 2017.

PETROFF, S. A. A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 21, p. 38-42, 1951.

PFYFFER, G. E.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures. In: MURRAY, P. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003. p. 532-559.

PINHEIRO, P. **Tuberculose**: causas, sintomas e tratamento. [S. l.], 2017. Disponível em: <www.mdsaude.com/2009/04/sintomas-de-tuberculose>. Acesso em: 20 mar. 2016.

PINTO, M. *et al.* Análise de custos de um teste de amplificação de ácido nucleico para o diagnóstico da tuberculose pulmonar sob a perspectiva do Sistema Único de Saúde. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 41, n. 6, p. 536-539, 2015.

RIBEIRO, L. **Medicina no Brasil colonial**. Rio de Janeiro: Sul Americana, 1971.

RICHELDI, L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. **American Lung Association**, New York, v. 174, p. 736-742, 2006.

RODRIGUES, C.; VADWAI, V. Tuberculosis: laboratory diagnosis. **The Clinical Laboratory Medicine**, New York, v. 32, n. 2, p. 111-127, Jun. 2012.

ROSEMBERG, J. Tuberculose – aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 5-29, 1999.

ROTH, V. R. *et al.* A Multi-Center Evaluation of Tuberculin Skin Test Positivity and Conversion Among Healthcare Workers in Brazilian Hospitals. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 9, n. 11, p. 1-8, 2005.

RUFFINO-NETTO, A. Interpretação da prova tuberculínica. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 546-547, 2006.

SALES, M. P. *et al.* Genetic diversity among *Mycobacterium bovis* isolates: a preliminary study of strains from animal and human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 12, p. 4558-4562, 2001.

SALO, W. L. *et al.* Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. **The National Academy of Sciences**, Washington, v. 91, n. 6, p. 2091-2094, 1994.

SÁNCHEZ, A. *et al.* A tuberculose nas prisões, uma fatalidade? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 12, p. 2510, 2006.

SÁNCHEZ, A. *et al.* Prevalence of pulmonary tuberculosis and comparative evaluation of screening strategies in a Brazilian prison. **The International Journal Tuberculosis Lung Disease**, Paris, v. 9, p. 633-639, 2005.

SANTOS, M. L. G. *et al.* Poverty: socioeconomic characterization at tuberculosis. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, São Paulo, v. 15, p. 762-767, 2007. Número especial.

SEPKOWITZ, K. A. AIDS, tuberculosis and health care workers. Infectious Diseases Society of America. **The Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 20, p. 232-242, 1995.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A.; KADHIRAVAN, T. HIV-TB co-infection: Epidemiology, diagnosis & management. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 121, n. 4, p. 550-567, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817963>>. Acesso em: 20 maio 2016.

SHEPPARD, D. de S. 'A literatura médica brasileira sobre a peste branca: 1870-1940'. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 172-192, 2001.

SILVA, V. M. *et al.* TST conversion among medical students at a teaching hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Infectious Control and Hospital Epidemiology**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 10, p. 591-594, 2002.

SIQUEIRA-BATISTA, R. **Miséria**. 3. ed. Rio de Janeiro: Kroart, 2007.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, New Jersey, v. 16, n. 3, p. 463-496, 2003.

SMITHWICK, R. W.; STRATIGOS, C. B. Acid-fast microscopy on polycarbonate membrane filter sputum sediments. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 13, p. 1109-1113, 1981.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. **Controle da Tuberculose**: uma proposta de integração ensino-serviço. 5. ed. Rio de Janeiro, 2002.

SOUSA, A. O. *et al.* An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. **Proceedings of the National Academy**, Washington, v. 94, p. 13227-13232, 1997.

SOUZA, M. V. N. Tuberculose em gestantes: um importante problema de saúde pública mundial. **Revista Brasileira de Farmácia**; Rio de Janeiro, v. 87, n. 4, p. 132-138, 2006.

STEINGART, K. R. *et al.* Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. **American Society for Microbiology**, Washington, v. 16, n. 2, p. 260-276, 2009.

STEINGART, K. R. *et al.* Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Expert review of anti-infective therapy. **The Indian Journal of Tuberculosis**, New Delhi, v. 5, n. 3, p. 327-331, 2007a.

STEINGART, K. R. *et al.* Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 6, n. 10, p. 664-674, 2006.

STUCKLER, D. *et al.* Mass incarceration can explain population increases in TB and multidrug-resistant TB in European and central Asian countries. **Proceedings of the National Academy**, Washington, v. 105, n. 36, p. 13280-13285, 2008.

STÜRENBURG, E.; JUNKER, R. Point-of-care testing in microbiology: the advantages and disadvantages of immunochromatographic test strips. **Deutsches Ärzteblatt International**, Cologne, v. 106, n. 4, p. 48–54, 2009.

TAKAO, E. K. H. *et al.* Comparação de métodos de cultivo para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar. **Acta scientiarum. Health sciences**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 183-188, 2005.

TEIXEIRA, P.; BORBA, C. M. Riscos Biológicos em Laboratórios de Pesquisa. In: TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2010. p. 67 -82.

TODAR, K. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis. In: _____. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**. Madison: University of Wisconsin, 2012. Disponível em: <<http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

TORTOLI, E. *et al.* Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. American Society for Microbiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 45-48, 2002.

TRAJMAN, A. *et al.* Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 31, n. 5, p. 1098-1106, 2008.

TUBERCULOSE. Calgary, 2015. Disponível em: <<http://www.istockphoto.com/br/search/more-like-this/465717134?mediatype=photography&excludenudity=true&sort=best>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS. Faculdade de Ciências Médicas. Departamento de Anatomia Patológica. **Tuberculose Meníngea Circunscrita em Paciente HIV +**. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/nptneurotbc2.html>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

VAN INGEN, J. *et al.* Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 18, n. 4, p. 653-655, Apr. 2012.

VAN RIE, A. *et al.* 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**, London, v. 10, n. 7, p. 937-946, 2010.

VENDRAMI, S. H. F. *et al.* Tuberculose em município de porte médio do sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade, de 1995 a 2003. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 3, p. 237-243, 2005.

WALLIS, R. S. *et al.* Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs and challenges. **The Lancet Infectious Disease**, New York, v. 13, n. 4, p. 3620372, Apr. 2013.

WELLS, W. F.; LURIE, M. B. Experimental airborne disease: quantitative natural respiratory contagion of tuberculosis. **American Journal of Epidemiology**, Washington, v. 34, n. 13, p. 21-40, 1941.

ANEXO A - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO PARA APRECIÇÃO ÉTICA (CAAE)



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0022.0.095.000-11	
Projeto de Pesquisa			
Validação da Pesquisa de BAAR em amostras de escarro tratadas com Hipoclorito de Sódio no diagnóstico da Tuberculose Pulmonar			
Área(s) Temática(s) Especial(s)		Grupo	Fase
Não se aplica			Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF	Pesquisador Responsável	<i>[Assinatura]</i> Assinatura	
12449830472	José Luiz de Oliveira Magalhães		
Comitê de Ética			
Data de Entrega	Recebimento:	<i>[Assinatura]</i> Assinatura	
19/05/2011			

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.



<http://portal2.saude.gov.br/sisnep/cep/caae.cfm?VCOD=429558>

19/5/2011

ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FIOCRUZ-PE



Título do Projeto: "Validação da pesquisa de BAAR em amostras de escarros tratadas com hipoclorito de sódio no diagnóstico da Tuberculose Pulmonar".

Pesquisador responsável: José Luiz de Oliveira Magalhães.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 18/05/2011

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 23/11

Registro no CAAE: 0022.0.095.000-11

PARECER Nº 26/2011

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 06 de julho de 2014. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 06 de julho de 2011.


 Rafael da Silveira Moreira
Cirurgião Dentista
Vice-Coordenador
Mat. SIAPE 1835510
CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 06/07/2012.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br



ANEXO C - NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO 1

Indian Journal of Medical Research



Instructions to the Authors

SCOPE

THE EDITORIAL PROCESS

TYPE OF MANUSCRIPTS

SUBMISSION OF MANUSCRIPT

1. FIRST PAGE FILE

2. ARTICLE FILE

3. TABLES & FIGURES 4. ETHICAL CLEARANCE CERTIFICATE

5. UNDERTAKING BY AUTHOR(S) & COPYRIGHT TRANSFER AGREEMENT

SCOPE

The Indian Journal of Medical Research (IJMR) is a biomedical journal with international circulation. It publishes original communications of biomedical research that advance or illuminate medical science or that educate the journal readers. It is issued monthly, in two volumes per year.

Manuscripts dealing with clinical aspects will be considered for publication, provided they contain results of original investigations. Articles need to be of general interest - e.g., they cross the boundaries of specialities or are of sufficient novelty and importance that the journal's readers, whatever be their speciality, should be made aware of the findings. **Research papers reporting original research, review articles (both narrative and evidence based), research correspondence**, letter to editor will be considered. View points and Perspectives are also considered. Papers of routine nature which are merely records of interesting cases, as also those dealing with modifications of routine methodology are not encouraged. Further, serialization of articles by the same author(s) into various parts (1,2,3, etc.) is strongly discouraged. In such cases the authors are advised to submit independent papers with self-sufficient titles and text.

The IJMR strongly discourages duplication/reduplication of data already published in other journals (even when certain cosmetic changes/additions are made). If and when duplication is detected after publishing in IJMR, the journal will be forced to 'retract' such articles. Articles based on work carried out in private nursing homes and other non-recognized hospitals/research institutes will be discouraged.

THE EDITORIAL PROCESS

All manuscripts submitted to the IJMR and considered suitable for processing are subject to peer review process. Authors need to certify in the covering letter that this manuscript has not been submitted to any other journal simultaneously.

All manuscripts are screened initially at the editorial office for suitability for consideration for publication.

Those found suitable are sent to 2-3 technical reviewers and one statistical expert based on the need. The journal follows the double blind peer review process.

After peer review process, manuscripts considered suitable for publication are suitably edited before publication.

The processes of submission of manuscript, peer review, communication of final decision and sending proofs are done through online system.

TYPE OF MANUSCRIPTS

1. Original Research Articles

The approximate length of article should not be more than 2500 words (excluding Abstract and References). Original research articles should include a structured abstract (of 250 words maximum) under four subheadings: (i) *Background & objectives*, (ii) *Methods*, (iii) *Results*, and (iv) *Interpretation & conclusions*, followed by 5-8 key words arranged alphabetically. The main article should include the sections in following order: Introduction, Material & Methods, Results, Discussion, Acknowledgment (if any), Conflicts of Interest and References. The permission from Ethics Committee/ Institutional Review Board (IRB) is mandatory for all studies on human subjects and animals and this should be mentioned in the Material & Methods section. Registration of clinical trials is mandatory and registration number/CTR number should be mentioned.

2. Reviews

Narrative review articles written by scientist(s)/ expert(s) working in the particular area and who has/have published quality original research, will be considered. The article could be about 15-20 typed pages with not more than 100 references (recent & relevant) and an unstructured abstract of about 250 words. Tables and Figures could be included as per requirement. Copyright permission should be obtained from the copyright holder in advance, if a published Table/Figure is reproduced in part or whole.

3. Systematic Reviews (Including Meta-analysis)

The articles under this section will be critical appraisal of different studies on important topics of clinical/public health significance to obtain an unbiased quantitative estimate of the overall effect of an intervention or variable for a defined outcome. The focus could be on cause, diagnosis, prognosis, therapy, prevention, etc. These would be thoroughly researched articles giving comprehensive and balanced perspective. There should be a structured abstract. Systematic reviews could be about 2500-3000 words with minimum number of Tables/Figures. These will be published subject to peer review.

4. Perspectives/Personal View/View point

These are primarily opinion pieces written by senior scientists, public health experts and policy makers. Such papers will be generally written by a single author. No anonymous articles will be published. These should be about 1000-1500 words and should contain references. Except for commissioned pieces, all submissions will be published subject to peer review.

5. Student IJMR

Aimed to encourage and promote the participation of students in medical research, this new section is started exclusively for medical undergraduate students. This section would also include reports of important scientific developments that will impact patient care, public health and/or career advancement. This section may also carry Abstracts of research done by students as part of ICMR's Short Term Studentship, DST's Kishore Vaigyanik Protsahan Yojana, etc. The length of the papers should not be more than 1000 words. All the

content in this section will be published subject to peer review.

6. Short Paper/ Research Correspondence/ Short Note

Original research manuscripts containing well defined study design and sample size but limited parameters analysed may be submitted as Short Papers. These would be about 2000 words and contain a structured abstract with a combined Results & Discussion section. A research correspondence would be either a preliminary/pilot study or a post-implicative report with no abstract. Submissions with preliminary investigative data with limited methodology and sample size but having important clinical implications may be submitted as a Short Note containing a 200 words unstructured abstract. Both Correspondence and Short Note would be of around 1000-1500 words containing either a Table and/or a Figure.

7. Clinical Images

Rare and educative cases may be presented under this section. A maximum of two authors are allowed per clinical image submission of whom, one should be a faculty associated with the case. A concise write up without reference or running title, of around 125-150 words may be submitted, containing details of the place (department/institute) and period (month/year) of patient presentation, diagnosis, treatment and follow up (along with the duration of follow up). It is mandatory to submit a duly signed patient's consent form (available on our official website). If the patient is in paediatric age group or deceased, the form may be signed by a family member or a close relative. Clear and well resolved images (up to 3-4 or as panels; JPEG/TIFF format with at least 300 dpi resolution) and up to two videos not exceeding 1MB may be submitted with the write up.

SUBMISSION OF MANUSCRIPT

The IJMR does not charge for submission and processing of the manuscript.

All manuscripts submitted for publication to the IJMR should include the following: **(1) First page file; (2) Article file; (3) Tables & figures; (4) A scanned copy of ethical clearance certificate; (5) Undertaking by authors & copyright transfer agreement.** Details are given below.

1.. FIRST PAGE FILE

This should include a Covering letter, Title page and Author's contribution in a single file.

- The covering letter should explain why the paper should be published in the IJMR, rather than a specialty journal. One of the authors should be identified as the corresponding author of the paper, who would be responsible for the contents of the paper as for communication with the Editorial office. Author should declare that the article was not published or under consideration, in part or whole, simultaneously in any other journal or proceedings.
- Title page should include (i) name(s) of author(s); (ii) highest degree; (iii) name(s) of the Department(s); (iv) designations (academic position) of authors in the department ; (v) complete postal addresses, mobile number and e-mail id of all authors; (vi) name of corresponding author with all above mentioned details.

Title page also should include: (i) Type of manuscript: original article/ review/ correspondence/ perspective/ view point/ clinical image/ letter to editor/student IJMR; (ii) Title; (iii) Short title; (iv) Number of Tables; (v) Number of Figures; (vi) Source of financial support in the form of grants; (vii) Registration number in case of Clinical Trials; (viii) STS number in case of Student IJMR.

- Specific author's contribution should be given at the end in the Title page.

2. ARTICLE FILE

Manuscripts must be submitted online through the website www.journalonweb.com/ijmr. First time users will have to register at this site. Registration is free but mandatory. Registered authors can keep track of their

articles after logging into the site using their user name and password. Authors do not need to pay for submission, processing or publication of articles. Manuscripts should be presented in as concise form as possible, typewritten neatly. Pages should be numbered consecutively and the contents arranged in the following order:

Title

Title of the article should be short, continuous (broken or hyphenated titles are **not** acceptable) and yet sufficiently descriptive and informative so as to be useful in indexing and information retrieval.

Title Page

Title page should include name(s) of author(s) with highest degree, departmental affiliations, designation (position) in the department and complete postal addresses, mobile no. with e-mails.

A short running title not exceeding 6-7 words must also be provided.

Abstract and key words :

All manuscripts should (except reviews) have a structured abstract (of about 250 words) with subheadings of *Background & objectives, Methods, Results, and Interpretation & conclusions*. Abstract should be brief and indicate the scope and significant results of the paper. It should only highlight the principal findings and conclusions so that it can be used by abstracting services without modification. Conclusions and recommendations not found in the text of the articles should not be inserted in the Abstract.

A set of suitable key words (6-8 in number) arranged alphabetically should be provided.

Introduction

Introduction should be brief and state precisely the scope of the paper. Review of the literature should be restricted to reasons for undertaking the present study and provide only the most essential background. The objective of the study should be written clearly with adequate justification at the end of this section.

Material & Methods

The nomenclature, the source of material and equipment used, with the manufacturers details in parenthesis, should be clearly mentioned. The procedures adopted should be explicitly stated to enable other workers to reproduce the results, if necessary. New methods may be described in sufficient detail indicating their limitations. Established methods can be just mentioned with authentic references and significant deviations, if any given, with reasons for adopting them. While reporting experiments on human subjects and animals, it should be clearly mentioned that procedures followed are in accordance with the ethical standards laid down by the national bodies or organizations of the particular country. For example, for research carried out in India on human subjects, the ICMR's Ethical guidelines for biomedical research on human participants (2006) should be adhered to. Similarly, for experiments on laboratory animals the ICMR's guidelines: Use of animals in scientific research (May 2006)/INSA's guidelines for care and use of animals in scientific research (2000) or guidelines of the Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals (CPCSEA) should be followed. Adequate information should be provided on the care and use of laboratory animals, source of animals, strain, age, sex, housing and nutrition, etc. Whenever needed, appropriate certification should be provided at the time of submission of the manuscripts. The drugs and chemicals used should be precisely identified, including generic name(s), dosage(s) and route(s) of administration.

Study design: Selection of the observational or experimental participants (patients or laboratory animals, including controls, whether randomly or consecutively) and basis of sample size calculation should be mentioned clearly, including eligibility and exclusion criteria and a description of the source population.

Contributors may consult the following Guidelines for specific study designs:

Sr. No.	Type of study	Source
1.	Randomized controlled trials (RCTs)	CONSORT- http://www.consort-statement.org
2.	Systematic reviews & meta-analysis	PRISMA guidelines- http://www.prisma-statement.org
3.	Observational studies in epidemio	STROBE - http://www.strobe-statement.org/
4.	Meta-analysis of observational studies in epidemiology	MOOSE - http://statswrite.eu/pdf/MOOSE%20Statement.pdf
5.	Studies on diagnostic accuracy	STARD - http://www.stard-statement.org

* For any other type of study contributors may consult ICMJE website (www.icmje.org)

Period (with month and year) and place of the study should be clearly stated.

Studies based on clinical trials: All clinical trials should be registered in a Primary Clinical Trial Registry and the Registration number be given under Material & Methods. Articles presenting with results of randomized clinical trials should provide information on all major study elements, including the protocol, assignment of interventions (methods of randomization, concealment of allocation to treatment groups), and the method of masking (blinding), based on the CONSORT Statement (<http://www.consort-statement.org/>). It should be clearly stated that study protocol was approved by the institutional/local ethics committee and written consent obtained from the participants.

The statistical analysis done and statistical significance of the findings when appropriate, should be mentioned. Unless absolutely necessary for a clear understanding of the article, detailed description of statistical treatment may be avoided. Articles based heavily on statistical considerations, however, need to give details particularly when new or uncommon methods are employed. For standard and routine statistical methods employed, authors need to give only authentic references.

Results:

Only such data as are essential for understanding the discussion and main conclusions emerging from the study should be included. The data should be arranged in unified and coherent sequence so that the report develops clearly and logically. Data presented in Tables and Figures should not be repeated in the text. Only important observations need to be emphasized or summarized. The same data should not be presented both in tabular and graphic forms. Interpretation of the data should be taken up only under the Discussion and not under Results.

Discussion:

The discussion should deal with the interpretation of results without repeating information already presented under Results. It should relate new findings to the known ones and include logical deductions. It should also mention any weaknesses/limitations/lacunae of the study.

The conclusions can be linked with the goals of the study but unqualified statements and conclusions not completely supported by the data should be avoided. Claiming of priority on work that is ongoing should also be avoided. All hypotheses should, if warranted, clearly be identified as such; recommendations may be included as part of the Discussion, only when considered absolutely necessary and relevant. This section should preferably end with a concluding remark.

Acknowledgment:

Acknowledgment should be brief and made for specific scientific/technical assistance and financial support only and not for providing routine departmental facilities and encouragement or for help in the preparation of the manuscripts (including typing or secretarial assistance).

Conflicts of interest:

A conflict of interest exists if authors or their institutions have financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their actions. A conflict can be actual or potential, and full disclosure to the Editor is absolute requirement. All submissions must include disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest.

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, authors should state so.

References:

The total number of References should normally be restricted to a maximum of 30 for Original Research Articles.

References to literature cited should be numbered consecutively and placed at the end of the manuscript. In the text they should be indicated above the line (superior). As far as possible mentioning names of author(s) under references should be avoided in text.

Articles in Journals: The titles of the journals should be abbreviated according to the style used by the PubMed.

1. *Standard journal article*

List the first six authors followed by et al.

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2002; 347 : 284-7.

More than six authors:

Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res* 2002; 935 : 40-6.

2. *Organization as author*

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 2002; 40 : 679-86.

3. *Both personal authors and an organization as author*

Vallancien G, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ; Alf-One Study Group. Sexual dysfunction in 1,274 European men suffering from lower urinary tract symptoms. *J Urol* 2003; 169 : 2257-61.

4. *No author given*

21st century heart solution may have a sting in the tail. *BMJ* 2002; 325 : 184.

5. *Article not in English*

Ellingsen AE, Wilhelmsen I. Sykdomsangst blant medisin- og jusstudenter. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2002; 122 : 785-7.

6. *Volume with supplement*

Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 2002; 42 (Suppl 2) : S93-9.

7. *Issue with supplement*

Glauser TA. Integrating clinical trial data into clinical practice. *Neurology* 2002; 58 (12 Suppl 7) : S6-12.

8. *Volume with part*

Abend SM, Kulish N. The psychoanalytic method from an epistemological viewpoint. *Int J Psychoanal.* 2002;83(Pt 2):491-5.

9. *Issue with part*

Ahrar K, Madoff DC, Gupta S, Wallace MJ, Price RE, Wright KC. Development of a large animal model for lung tumors. *J Vasc Interv Radiol* 2002; 13 (9 Pt 1) : 923-8.

10. *Issue with no volume*

Banit DM, Kaufer H, Hartford JM. Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop* 2002; (401) : 230-8.

11. *No volume or issue*

Outreach: bringing HIV-positive individuals into care. *HRSA Careaction*. 2002 Jun:1-6.

12. *Pagination in roman numerals*

Chadwick R, Schuklenk U. The politics of ethical consensus finding. *Bioethics*. 2002;16(2):iii-v.

13. *Type of article indicated as needed*

Tor M, Turker H. International approaches to the prescription of long-term oxygen therapy [letter]. *Eur Respir J* 2002; 20 : 242.

Lofwall MR, Strain EC, Brooner RK, Kindbom KA, Bigelow GE. Characteristics of older methadone maintenance (MM) patients [abstract]. *Drug Alcohol Depend* 2002; 66 (Suppl 1) : S105.

14. *Article containing retraction*

Feifel D, Moutier CY, Perry W. Safety and tolerability of a rapidly escalating dose-loading regimen for risperidone. *J Clin Psychiatry* 2002; 63 : 169. Retraction of: Feifel D, Moutier CY, Perry W. *J Clin Psychiatry* 2000; 61 : 909-11.

15. *Article retracted*

Feifel D, Moutier CY, Perry W. Safety and tolerability of a rapidly escalating dose-loading regimen for risperidone. *J Clin Psychiatry* 2000; 61 : 909-11. Retraction in: Feifel D, Moutier CY, Perry W. *J Clin Psychiatry* 2002; 63: 169.

16. *Article republished with corrections*

Mansharamani M, Bolesta S. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther* 2000; 22 : 1151-68; discussion 1149-50. Erratum in: *Clin Ther* 2001; 23 : 309.

17. *Article with published erratum*

Malinowski JM, Bolesta S. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther*. 2000;22(10):1151-68; discussion 1149-50. Erratum in: *Clin Ther* 2001;23(2):309.

18. *Article published electronically ahead of the print version*

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood* 2002 Nov 15; 100 : 3828-31. Epub 2002 Jul 5.

Books and Other Monographs

19. *Personal author(s)*

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

20. *Editor(s), compiler(s) as author*

Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP, editors. *Operative obstetrics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002.

21. *Author(s) and editor(s)*

Breedlove GK, Schorfheide AM. *Adolescent pregnancy*. 2nd ed. Wieczorek RR, editor. White Plains (NY): March of Dimes Education Services; 2001.

22. *Organization(s) as author*

Royal Adelaide Hospital; University of Adelaide, Department of Clinical Nursing. Compendium of nursing research and practice development, 1999-2000. Adelaide (Australia): Adelaide University; 2001.

23. *Chapter in a book*

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

24. *Conference proceedings*

Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editors. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK. New York: Springer; 2002.

25. *Conference paper*

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editors. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

26. *Scientific or technical report*

Issued by funding/sponsoring agency:

Yen GG (Oklahoma State University, School of Electrical and Computer Engineering, Stillwater, OK). Health monitoring on vibration signatures. Final report. Arlington (VA): Air Force Office of Scientific Research (US), Air Force Research Laboratory; 2002 Feb. Report No.: AFRLSRBLTR020123. Contract No.: F496209810049.

Issued by performing agency:

Russell ML, Goth-Goldstein R, Apte MG, Fisk WJ. Method for measuring the size distribution of airborne Rhinovirus. Berkeley (CA): Lawrence Berkeley National Laboratory, Environmental Energy Technologies Division; 2002 Jan. Report No.: LBNL49574. Contract No.: DEAC0376SF00098. Sponsored by the Department of Energy.

27. *Dissertation*

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

28. *Patent*

Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible endoscopic grasping and cutting device and positioning tool assembly. United States patent US 20020103498. 2002 Aug 1.

Other Published Material

29. *Newspaper article*

Tynan T. Medical improvements lower homicide rate: study sees drop in assault rate. The Washington Post. 2002 Aug 12;Sect. A:2 (col. 4).

30. *Audiovisual material*

Chason KW, Sallustio S. Hospital preparedness for bioterrorism [videocassette]. Secaucus (NJ): Network for Continuing Medical Education; 2002.

31. *Legal Material*

Public law: Veterans Hearing Loss Compensation Act of 2002, Pub. L. No. 107-9, 115 Stat. 11 (May 24, 2001).

Unenacted bill: Healthy Children Learn Act, S. 1012, 107th Cong., 1st Sess. (2001).

Code of Federal Regulations: Cardiopulmonary Bypass Intracardiac Suction Control, 21 C.F.R. Sect. 870.4430 (2002).

Hearing: Arsenic in Drinking Water: An Update on the Science, Benefits and Cost: Hearing Before the Subcomm. on Environment, Technology and Standards of the House Comm. on Science, 107th Cong., 1st Sess. (Oct. 4, 2001).

32. *Map*

Pratt B, Flick P, Vynne C, cartographers. Biodiversity hotspots [map]. Washington: Conservation International; 2000.

33. *Dictionary and similar references*

Dorland's illustrated medical dictionary. 29th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. Filamin; p. 675.

Unpublished Material

34. *In press*

(Note: NLM prefers "forthcoming" because not all items will be printed.)

Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M. Signature of balancing selection in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. In press 2002.

Electronic Material

35. *CD-ROM*

Anderson SC, Poulsen KB. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

36. *Journal article on the Internet*

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>, accessed on August 12, 2002.

37. *Monograph on the Internet*

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>, accessed on July 9, 2002.

38. *Homepage/Web site*

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>, accessed on July 9, 2002.

39. *Part of a homepage/Web site*

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>, accessed on August 12, 2002.

40. *Database on the Internet*

Open database: Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>, accessed on March 8, 2001.

Closed database: Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

41. *Part of a database on the Internet*

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly.

3. TABLES & FIGURES

Tables (and graphs in MS Word format) should be included in main Article file in MS Word file format. Tables should be numbered consecutively with Roman numerals (I, II, III, etc). They should bear brief title and

column headings should also be short. Units of measurement should be abbreviated and placed below the headings. Statistical measurement variations such as SD and SE should be identified. Inclusion of structural formulae in Tables should be avoided. Abbreviations used be given in the footnote.

Figures should be submitted in JPEG or TIFF format (size not more than 1 MB), numbered consecutively in Arabic numerals with appropriate Title and explanation of symbols in the legends for illustrations. Within a multi-panel figure, different parts should be labelled as A, B, C,...etc. on top left corner.

xvi

Photomicrographs should have internal scale markers regarding details of magnification to facilitate reduction in size in final print. Symbols, arrows and letters used in the photomicrographs should be legible and in contrast with the background. Graphs in JPEG/TIFF format can be uploaded as Figures.

All published material should be acknowledged and copyright material should be submitted along with the written permission of the copyright holder.

Enzyme Nomenclature

For enzymes, only the trivial names recommended by the IUPAC-IUB Commission should be used. At its first citation in the text of the paper its code number and systematic name should be indicated.

Abbreviations

Only standard abbreviations are to be used. The abbreviations should conform to the International System of Units (SI), throughout the text, Tables and Figures. Generic names of the drugs should be used. If proprietary brands are used in research brand name, name of manufacturer and country should be given in parentheses after the generic name at the first place of use.

4. ETHICAL CLEARANCE CERTIFICATE

All studies conducted on patients / volunteers/ Human biological material/animals should submit a scanned copy of Ethical Clearance Certificate.

5 UNDERTAKING BY AUTHOR(S) & COPYRIGHT TRANSFER AGREEMENT *Downloadable form*

It is necessary that all the authors give an undertaking (in the format specified by the journal) indicating their consent to be co-authors in the sequence indicated on the title page. Each author should give his or her names as well as the address and appointment current at the time the work was done, plus a current address for correspondence including telephone and fax numbers and email address. A senior author may sign the Undertaking by Authors for a junior author who has left the institution and whose whereabouts are not known and take the responsibility.

A paper with corporate (collective) authorship must specify the key persons responsible for the article; others contributing to the work should be recognized separately.

Author(s) will be asked to sign a transfer of copyright agreement, which recognizes the common interest that both journal and author(s) have in the protection of copyright. It will also allow us to tackle copyright infringements ourselves without having to go back to authors each time.

Molar (mole/litre)	M*	counts per minute	cpm
milli molar (m mole/litre)	mM	Curie	Ci
Micromolar (mole/litre)	μM	rad	rad
mole (quantity of substance)	mol	Roentgen	R
normal	N	gravity	g

metre	m	ortho	o
centimetre	cm	meta	m
square centimetre	cm ²	para	p
millimetre	mm	intramuscular	im
micrometre	µm	intraperitoneal	ip
nanometre	nm	intravenous	iv
picometre	pm	subcutaneous	sc
mg/ 100 ml	mg/dl	oral	po
Angstrom	Å	lethal dose-50	LD ₅₀
Litre	l	Ampere	A
millilitre	ml	milli Ampere	mA
microlitre	µl	Watt	W
gram	g	anti meridiem (before noon)	am
milligram	mg	post meridiem (after noon)	pm
kilogram	kg	volume	vol
hour(s)	h	volume ratio	vol/vol
minute(s)	min	(volume per volume)	
second(s)	sec	weight	wt
week(s)	wk	weight per volume	wt/vol
year(s)	yr	weight ratio	wt/wt
Probability			
(statistical significance)	P	(weight per weight)	

PROOFS

Authors of accepted articles are supplied of printer's proofs online on their Author centre and will also receive email alerts when proofs are available. Corrections on the page proofs should be restricted to printer's errors only and no substantial additions/deletions should be made. No change in the names of the authors (by way of additions and deletions) is permissible at the proof stage. If there are valid reasons for such a change, after acceptance of a paper, the permission of the Editor-In-Chief must be sought.

Standard abbreviations to be used in IJMR. The abbreviations should be used in the text, tables and illustrations without a full stop. *Should not be used as an abbreviation for mole

UNDERTAKING BY AUTHORS

We, the undersigned, give an undertaking to the following effect with regard to our article entitled "

submitted for publication in the **Indian Journal of Medical Research :-**

1. The article mentioned above has not been published or submitted to or accepted for publication in any form, in any other journal.

2. We also vouchsafe that the authorship of this article will *not* be contested by anyone whose name(s) is/are not listed by us here.

3. I/We declare that I/We contributed significantly towards the research study i.e., (a) conception, design and/or analysis and interpretation of data and to (b) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and on (c) final approval of the version to be published.

4. I/We hereby acknowledge IJMRs conflict of interest policy requirement to scrupulously avoid direct and indirect conflicts of interest and, accordingly, hereby agree to promptly inform the editor or editor's designee of any business, commercial, or other proprietary support, relationships, or interests that I/We may have which relate directly or indirectly to the subject of the work.

5. I/We also agree to the authorship of the article in the following sequence:-

Authors' Names (in sequence)	Signature of Authors
1. _____	_____
2. _____	_____
3. _____	_____
4. _____	_____

Important

(i). All the authors are required to sign **independently** in this form in the **sequence** given above. In case an author has left the institution/country and whose whereabouts are not known, the senior author may sign on his/her behalf taking the responsibility.

(ii). **No addition/deletion/** or any **change** in the sequence of the authorship will be permissible at a later stage, without valid reasons and permission of the **Editor -In-Chief**.

(iii). **If the authorship is contested at any stage, the article will be either returned or will not be processed for publication till the issue is solved.**

Copyright Transfer Agreement Form

This document must be signed by all authors and submitted with the manuscript.

COPYRIGHT TRANSFER AGREEMENT

The Indian Journal of Medical Research(IJMR) is published monthly by the Indian Council of Medical Research, V. Ramalingaswami Bhawan, Ansari Nagar, New Delhi-110029 (India).

The IJMR and Authors hereby agree as follows: In consideration of IJMR reviewing and editing the following describedwork for first publication on an exclusive basis:

Title of manuscript:

The undersigned author(s) hereby assigns, conveys, and otherwise transfers all rights, title, interest, and copyright ownership of said work for publication. Work includes the material submitted for publication and any other related material submitted to IJMR. In the event that IJMR does not publish said work, the author(s) will be so notified and all rights assigned hereunder will revert to the author(s).

The assignment of rights to IJMR includes but is not expressly limited to rights to edit, publish, reproduce, distribute copies, include in indexes or search databases in print, electronic, or other media, whether or not in use at the time of execution of this agreement, and claim copyright in said work throughout the world for the full duration of the copyright and any renewals or extensions thereof.

IJMR shall own the work, including (1) copyright; (2) the right to grant permission to republish **the article in whole or in part, with or without fee; (3) the right to produce preprints or reprints** and translate into languages other than English for sale or free distribution; and (4) the right to republish the work in a collection of articles in any other mechanical or electronic format.

The article will be published under the terms of the latest Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike License, unless the journal notifies the author otherwise in writing.

The author(s) hereby represents and warrants that they are sole author(s) of the work, that all authors have participated in and agree with the content and conclusions of the work, that the work is original, and does not infringe upon any copyright, propriety, or personal right of any third party, and that no part of it nor any work based on substantially similar data has been submitted to another publication.

Authors' Names (in sequence)	Signature of Authors
1 _____	_____
2 _____	_____
3 _____	_____

Online Manuscript Submission Check List

1. Covering letter and Title page should be submitted as single file in **First page file**.
2. Manuscript with Abstract & Key words should be submitted as **Article file**.
3. Tables and graphs should be submitted in supporting material in **Images section** (word document format).
4. Figures (excluding graphs) should be submitted in **Images section** (jpeg format)
5. Scanned images of **Undertaking and Copyright Transfer Agreement Form** duly signed by all authors should be submitted as single file(sequence of authors should be maintained as per title page).
6. Scanned image of **Ethical Clearance certificate** should be submitted.
7. **Patient consent form** for clinical images should be uploaded.

ANEXO D - NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO 3

Revista de Saúde Pública

Guide to authors

1. Introduction

Manuscripts are accepted in the following languages: Portuguese, Spanish and English.

The manuscript of an original research should follow the structure known as IMRD: Introduction, Methods, Results and Discussion (Text Structure). Manuscripts based on qualitative research may have other formats, assimilating Results and Discussion in a single section and Final Remarks/Conclusions. Other categories of manuscripts (reviews, commentaries etc.) follow appropriate specific text formats.

Studies should be presented so that any interested researcher may be able to reproduce the results. Therefore, we encourage the use of the following recommendations, according to the category of the submitted manuscript:

- CONSORT**-checklist and fluxogram for controlled and randomized essays
- STARD**-checklist and fluxogram for diagnostic accuracy studies
- MOOSE**-checklist and fluxogram for meta-analysis and systematic reviews of observational studies
- PRISMA**-checklist and fluxogram for systematic reviews and meta-analysis
- STROBE**-checklist for observational studies in epidemiology
- RATS** checklist for qualitative studies

Details of the items required for submission of the manuscript are described according to the article category.

2. Article categories

a) Original Articles

Include observational studies, experimental or quasi-experimental studies, programs evaluation, cost-effectiveness analysis, decision analysis and studies on evaluation of diagnostic tests performance for population screening. Each article should contain clear objectives and hypotheses, design and methods used, results, discussion and conclusions. Also include theoretical essays (critical and formulation of relevant theoretical knowledge) and articles dedicated to the presentation and discussion of methodological aspects and techniques used in public health research. In this case, the text should be divided into topics to guide the reader, regarding the essential elements of the argument being developed.

Measuring instruments in population surveys

Manuscripts dealing with measuring instruments may include aspects of the development, evaluation and cross-cultural adaptation for use in population studies, excluding those of clinical application, which do not fall within the scope of RSP.

To the manuscripts exploring measuring instruments, we recommend the presentation of a detailed assessment of the construct being evaluated, including possible intensity gradient and sub-dimensions. The development of a new instrument should be supported by the existing

literature, explicitly identifying the failure of previous proposals and justifying the need for a new instrument.

The proposal, selection and preparation of the items should be detailed, as well as the employment of strategies to adapt them to the construct, including the use of qualitative research techniques (in-depth interviews, focus groups etc.), meetings with expert panels, among others. The route taken in defining the way items are measured and pre-tests conducted with its preliminary settings, should be described in the text. The evaluation of face, content, criterion, construct and/or dimensional validity should be presented in detail.

Instrument reliability analysis should also be presented and discussed, including internal consistency measures, test-retest reliability and/or inter-observer agreement. Authors should explain the selection process of the final instrument and place it in a critical and comparative perspective with other instruments used to measure the same construct or similar constructs.

Manuscripts on **cross-cultural adaptation** of measuring instruments, should meet, in general, all the recommendations mentioned above, and should also clarify the guiding theoretical model used in the process. Authors should also justify the choice of an instrument for adaptation to a specific sociocultural context, based on thorough literature review. Finally, authors should explicitly state which steps of the theoretical model were used, and how they were employed, for the adaptation of the work submitted for publication.

Note: The measurement instrument should be included as an annex of the submitted articles.

During the preparation of the manuscript, in addition to the recommendations mentioned above, please check the following formatting instructions.

Formatting:

- Should include up to 3500 words (excluding abstracts, tables, figures and references).
- Number of tables/figures: up to 5 in total.
- Number of references: up to 30 in total.
- Abstracts in the structured format with up to 300 words.

b) Brief communications

Short reports of findings that are of interest to public health, but do not support a more comprehensive analysis and a more lengthy discussion.

Formatting: The presentation should follow the same guidelines required for all original articles.

- Must contain up to 1500 words (excluding abstracts, tables, figures and references)
- Number of tables/figures: one table or figure.
- Number of references: up to 5 in total.
- Abstracts in the narrative format with up to 100 words.

c) Review articles

Systematic review and meta-analysis – By summarizing results of original studies, quantitative or qualitative, it seeks to answer the specific question of relevance to public health. It describes in detail the search process of the original studies, the criteria used to

select those that were included in the review and the procedures used in the synthesis of the results obtained through the studies reviewed. Check:

[MOOSE](#) checklist and fluxogram for meta-analysis and systematic reviews of observational studies

[PRISMA](#) checklist and fluxogram for systematic reviews and meta-analysis

Narrative/critical review – The narrative or critical review has a descriptive-discursive character, dedicated to the comprehensive presentation and discussion of scientific issues in the field of Public Health. Should clearly formulate a scientific object of interest, logical reasoning, theoretical and methodological review of the studies consulted and a concluding summary. It should be elaborated by researchers with experience in the field concerned or by experts of recognized competence.

Formatting:

- Must contain up to 4000 words (excluding abstracts, tables, figures and references).
- Number of tables/figures: up to 5 in total.
- Number of references: no limits.
- Abstracts in the structured format with up to 300 words or in a narrative format with up to 150 words.

d) Commentary

Aim to stimulate discussion, introduce the debate and “fuel” controversies about relevant aspects of public health. The text should be divided into topics or subtopics and the Introduction should include the subject and its importance. Cited references should support the main issues addressed in the article.

Formatting:

- Must contain up to 2000 words (excluding abstracts, tables, figures and references).
- Number of references: up to 30 in total.
- Number of tables/figures: up to 5 in total.
- Abstracts in a narrative format with up to 150 words.

We also publish Letters to the Editor with up to 600 words and 5 references.

3. Data for Manuscript Identification

Authorship

The concept of authorship is based on the substantial contribution of each of the people listed as authors, especially regarding the design of the research project, analysis and interpretation of data, writing and critical review. The contribution of each author should be made clear in a statement for this specific purpose. The inclusion of authors whose contribution does not meet the above criteria are not justified.

Author's identification data (registration)

Name and surname: The author should follow the format in which he/she has already been indexed in the databases.

Correspondence: It must contain the name and address of the author responsible for correspondence.

Institution: Up to three institutional affiliation hierarchies may be included (e.g. department, college, university).

Coauthors: Identify the coauthors of the manuscript by name, surname and institution, following the order of authorship.

Research funding: If the research was subsidized, the type of aid, the name of the funding agency and the process number should be indicated.

Prior Presentation: If the research has already been presented at a scientific meeting, indicate the event name, place and year of completion.

4. Conflict of interests

When based on a thesis or dissertation, indicate the author's name, title, year, name of the graduate program and the institution where it was presented.

The public confidence in the peer review process and the credibility of published articles depend, in part, on how conflicts of interest are managed during the writing, peer review and decision-making by the editors.

Conflicts of interest may arise when authors, reviewers and editors have interests that, clear or not, may influence the development or the evaluation of the manuscripts. Conflict of interest can be personal, commercial, political, academic or financial in nature.

When authors submit a manuscript, they are responsible for recognizing and disclosing financial conflicts or others, which may have influenced their work. Authors must acknowledge all financial support for the work and other financial or personal connections linked to the research. The reporter should disclose to the editors any conflicts of interest that could bias their opinions of the manuscript, and, when appropriate, should declare himself/herself unqualified to review it.

If the authors are not certain what may constitute a potential conflict of interest, they should contact the editorial office.

5. Statements and documents

In accordance with the guidelines of the *International Committee of Medical Journal Editors*, some documents and statements are requested from the author(s) for the evaluation of the manuscript. Observe the list of documents below and, when applicable, attach the document to the process. The moment when these documents will be requested varies:

Document/statement	Who signs	When to attach
a. Presentation letter	All authors	At submission
b. Responsibility Statement	All authors	At submission
c. Responsibility for Acknowledgments	Responsible author	After approval
d. Copyright Transfer	All authors	After approval

a) Presentation letter

The letter should be signed by all the authors and should contain:

- Information on the findings and most important conclusions of the manuscript, explaining its significance to public health.
- If the authors have articles published in the line of research of the manuscript, mention up to three.
- Responsibility Statement for each author: have substantially contributed to the conception and design, or analysis and interpretation of the data; have significantly contributed to the manuscript draft or critical review of the content; and have participated in the approval of the final version of the manuscript. For more information about authorship criteria, see the RSP site.
- Statement of potential conflicts of interest of the authors.
- Confirm the exclusive submission of the manuscript to RSP.
- Answer – What is new in your study? Why should it be published in this journal?

b) Responsibility Statement

According to the authorship criteria of the *International Committee of Medical Journal Editors*, authors should meet all the following conditions: (1) have significantly contributed to the conception and design, or analysis and interpretation of data; (2) have significantly contributed to the elaboration of the draft or critical review of the content; and (3) have been involved in the approval of the final version of the manuscript.

In case of a large or multi-centered group having developed the work, the group should identify the individuals who accepted direct responsibility for the manuscript. These individuals should fulfill the criteria for authorship defined above and editors will ask them to submit the statements required in the submission of manuscripts. The corresponding author should clearly indicate the preferred citation for the group name and identify its members. Usually, names will be listed at the end of the article.

Acquisition of funding, data collection, or general supervision of the research group, alone, do not justify authorship.

All those listed as authors must sign a responsibility statement.

c) Acknowledgments

Should include the names of those who, though not fulfilling the requirements for authorship, provided collaboration to the work. The reason for the acknowledgement should be cited, for instance, scientific advice, critical review of the manuscript, data collection etc. Those mentioned should have allowed the inclusion of their names and the author must attach the Responsibility Statement for the Acknowledgments. This part may also include any logistical support from institutions.

d) Copyright Transfer

All authors should read, sign and send this document, transferring their copyrights. The article will only be released for publication when the document is in the possession of RSP.

6. Preparation of the manuscript

Title in the original language of the manuscript and in its English version: The title should be concise and complete, containing relevant information to enable recovery of the article in the databases. The limit is 90 characters, including spaces. If the manuscript is submitted in English, please provide the title in Portuguese as well.

Short title: It should contain up to 45 characters.

Descriptors: Should include between 3 and 10, obtained from the [“Descritores em Ciências da Saúde” \(DeCS\)](#) (based on the [Medical Subject Headings \(MeSH\)](#)) when in Portuguese, Spanish and English. If appropriate descriptors to the theme of the manuscript are not found, free terms may be indicated (or keywords), even though non-existent in these established vocabularies.

Figures and Tables: All graphical and tabular elements displayed should be identified as figures or tables, and sequentially numbered, starting with one, and not as charts, graphs etc.

Abstract: Abstracts are published in Portuguese, Spanish and English. For the registration of the manuscript, two abstracts must be presented, one in the original language of the manuscript and the other in English (or Portuguese, if the manuscript submitted is in English). The specifications for the type of abstract are described in each of the article categories. As a general rule, the abstract should include: the objective of the study, the main methodological procedures (study population, place and year, observational and analytical methods), main results and the conclusions.

Text structure

Introduction: Should be short, describing the context and the justification of the study, supported by references relevant to the objective of the manuscript, which must be made clear at the end of this part. No results or conclusions of the study being presented should be mentioned.

Methods: The procedures adopted should be clearly described; as well as the variables analyzed, with its respective definitions when necessary and the hypothesis to be tested. Descriptions should include population and the sample, measuring instruments, with the presentation, if possible, of the validity measures; and contain information on the collection and processing of the data. Due reference to the methods and techniques employed, including statistical methods should be included; new or substantially modified methods should be described, explaining the reasons for their use and citing their limitations. The research ethical criteria must be met. The authors should state that the research was conducted within the ethical standards and approved by the ethics committee.

Results: Should be presented in a logical sequence, starting with the description of the most important data. Tables and figures should be restricted to those necessary for argument and description of the data in the text should be restricted to the most important. Graphs should be used to highlight the most relevant results and summarize complex relationships. Data in graphs and tables should not be duplicated or repeated in the text. Numerical results should specify the statistical methods used in the analysis. Extra or additional material and technical details may be disclosed in the electronic version of the article.

Discussion: From the data obtained and the results achieved, new and important aspects observed should be interpreted in the light of the scientific literature and existing theories in the field. Arguments and evidence based on personal communication or disclosed in restricted documents cannot serve to support the author's arguments. Both the limitations of the work

and its implications for future research should be clarified. Include only assumptions and generalizations based on work data. The results should bring up the rear of this part, reiterating the article's objective.

References

Listing: References should be standardized according to the **Vancouver style** – [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication](#), organized in order of citation. The titles of the journals should be referred to in their abbreviated format, according to PubMed, and italicized. In cases of publications with up to six authors, cite them all; above six, cite the first six, followed by the Latin expression “et al”. References by the same author should be arranged in ascending chronological order. Whenever possible, include the aforementioned documented DOI in accordance with the following examples.

Examples:

Journal articles

Narvai PC. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. Cienc Saude Coletiva. 2000;5(2):381-92. DOI:10.1590/S1413-81232000000200011

Zinn-Souza LC, Nagai R, Teixeira LR, Latorre MRDO, Roberts R, Cooper SP, et al. Fatores associados a sintomas depressivos em estudantes do ensino médio de São Paulo, Brasil. Rev Saude Publica. 2008;42(1):34-40. DOI:10.1590/S0034-89102008000100005

Books

Wunsch Filho V, Koifman S. Tumores malignos relacionados com o trabalho. In: Mendes R, coordenador. Patologia do trabalho. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2003. v.2, p. 990-1040.

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer Washington: National Academy Press; 2001[cited 2003 jul 13] Disponível em: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149

For other examples, we recommend consulting the guidelines ([“Citing Medicine”](#)) of the National Library of Medicine.

References to documents not indexed in the international scientific literature, generally confined to an institution or to an event (theses, research reports, presentations at events, among others) and information extracted from electronic documents, not permanently kept in sites, if relevant, must appear in the footnotes of the pages, where the citation appears.

Text citation: Reference should be indicated by its number in the list, placed as a superscript after the punctuation in the text, without using parentheses, brackets and the like. In cases in which the author's name and year of quotation is relevant, the reference number should be placed after the author's name. Works with two authors should refer to the two authors linked by “and”. In other cases, should display only the first author (followed by “et al.” in cases of multiple authors).

Examples:

The promotion of health in the population has as a reference the article by Evans and Stoddart⁹, which considers the distribution of income, social development and individual reaction in determining health and disease processes.

According to Lima et al.⁹ (2006), the prevalence of mental disorders in medical students is higher than in the general population.

Tables

Should be presented at the end of the text, after the references, consecutively numbered with Arabic numerals in the order they are mentioned in the text. Each one should have a brief title, no horizontal or vertical markings. Notes should be placed at the footnotes of the table and not in the header or title. If a table is extracted from another work, previously published, authors should formally request authorization from the journal which published it, for reproduction.

For a readable table, the maximum number of columns is 10, depending on the amount of the contents of each cell. Notes in tables should be indicated by letters and be underlined.

Figures

Illustrations (photographs, drawings, graphs etc.) should be cited as Figures and numbered consecutively with Arabic numerals in the order they are mentioned in the text and presented after the tables. Should contain a title and caption displayed at the bottom of the figure. They will only be accepted for publication if sufficiently clear and with digital quality, preferably in the vector format. In the JPEG format, the minimum resolution is 300 dpi. Graphs presented with gridlines will not be accepted, and the elements (bars, circles) should not present volume (3-D). If there is a figure extracted from another work, previously published, authors must request permission in writing to reproduce it.

7. Checklist for submission

1. Name of each author and his/her affiliated institution, including e-mail and telephone.
2. Title of the manuscript in Portuguese and in English, with up to 90 characters, including spaces between words.
3. Short title with up to 45 characters.
4. Article presented in Arial, size 12, in the Word format or similar (doc, docx and rtf).
5. Structured abstracts for original research papers in two languages, one of them necessarily in English.
6. Narrative abstracts for manuscripts that are not research in two languages, one of them necessarily in English.
7. Presentation Letter, stating the responsibility of authorship and conflict of interest, signed by all the authors.
8. Name of the funding agency and process number(s).
9. References should follow the Vancouver guidelines, organized in order of citation, making sure that they are all cited within the text.
10. Tables should be sequentially numbered, with title and notes, with a maximum of 10 columns.
11. Figure in the vector format or in pdf, or tiff, or jpeg, or bmp must have a minimum resolution of 300 dpi; when it comes to graphics, they should be without gridlines and without volume.
12. Tables and figures should not exceed a total of five, in total.

8. Editorial process

a) Review of the scientific writing

To be published, the approved manuscript is submitted for review of scientific writing, grammar and style. RSP reserves the right to make amendments, seeking perfect communication with the readers. The corresponding author will have access to all the modifications suggested until the very last proof submitted. Even the English version of the article will be available for review.

b) Proofs

After its approval by the editors, the manuscript will be checked by a team, responsible for reviewing: scientific writing (clarity, brevity, objectivity and soundness), grammar and style.

The corresponding author will receive a proof, in text file (doc, docx or rtf) with the comments/changes made by the technical reading staff. The deadline for reviewing this proof is two days.

If there are still doubts in this proof, the editorial team will contact the author for a review, until a final version of the text can be reached. Then, the final text will undergo a grammar review. After this review, the author will receive a new proof, in the final form for publication. In this last review, only error corrections can be made, format adjustments will not be accepted. The deadline for the final review is of one day.

Articles submitted in Portuguese or Spanish will be translated into English. About a week after the author has finished proofreading the article, RSP will send the English version of the article for the author's consideration. During this review, the author should pay attention to possible misinterpretations, vocabulary area and mainly content equivalence with the "approved original" version. The deadline for reviewing the English version is two days.

The Journal adopts a continued publishing system (rolling pass). Thus, the publication of the article becomes faster: it is not dependent on other articles to compose an issue, but the individual process of each article. Therefore, we request compliance with the deadlines.

9. Charge per article published

Although journals receive subsidies from public institutions, these are not sufficient for their maintenance. Thus, charging a publication fee has become an alternative to ensure the necessary resources for the production of RSP.

University of São Paulo ensures basic resources, but they are not sufficient. So, we have to rely on additional resources, besides funding agencies.

RSP completed 50 years in 2016, and only in 2012 it has started charging publication fees, an imperative fact to ensure its continuity, especially allowing to evolve with more advanced technologies that also require higher quality and technological resources.

The amount charged is evaluated regularly. Therefore, for articles submitted from **January 2017** onwards, the fee values will be R\$ 2,200.00 (or the equivalent in US dollars) for original articles, reviews and comments, and R\$ 1,500.00 (or the equivalent in US dollars) for brief communication.

RSP will provide authors the documents necessary to prove the fee payment to institutions, graduate programs or research funding institutions.

ANEXO E - COMPROVAÇÃO DE ACEITE DO ARTIGO 2

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical



Mycobacterium tuberculosis microscopy detection using a processed sputum smear

Journal:	Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
Manuscript ID	RSBMT-2017-0238.R2
Manuscript Type:	Short Communications
Keyword:	Tuberculosis, Sputum processed, Smear microscopy

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Decision Letter (RSBMT-2017-0238.R2)

From: dalmo@rsbmt.uftm.edu.br

To: joseluiz@cpqam.fiocruz.br

joseluiz@cpqam.fiocruz.br, jfd@cpqam.fiocruz.br,

CC: anaaaraujo@gmail.com, maninhaw@hotmail.com.br,
nilma@cpqam.fiocruz.br, aalmeida@cpqam.fiocruz.br

Subject: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the
Brazilian Society of Tropical Medicine - Decision on Manuscript ID
RSBMT-2017-0238.R2

Body: 17-Nov-2017

Dear Mr. Magalhães:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "<i>Mycobacterium tuberculosis </i>microscopy detection using a processed sputum smear" in its current form for publication in the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. Dalmo Correia

Editor-in-Chief, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical /
Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

dalmo@rsbmt.uftm.edu.br

Date Sent: 17-Nov-2017