

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós- Graduação em Ciências-Biológicas Bioquímica

Avaliação da técnica de PCR *in house* no diagnóstico de Tuberculose Pulmonar

Luciene Cardoso Scherer

Orientador: Dr. Afrânio Kritski

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas - Bioquímica**

2007

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós- Graduação em Ciências-Biológicas Bioquímica

Avaliação da técnica de PCR *in house* no diagnóstico de Tuberculose Pulmonar

Luciene Cardoso Scherer

Orientador: Dr. Afrânio Kritski

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas - Bioquímica**

2007

Dedicatória

Dedico este trabalho a meu pai, obrigada pelo exemplo de trabalho, luta e dedicação.

Citações

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

- À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por fornecer o suporte institucional.
- Ao Pós Graduação de Ciências Biológicas- Bioquímica por acreditar e apostar neste estudo, mesmo este não sendo o foco de suas linhas de pesquisa.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo fomento do estudo.
- À Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), por fornecer suporte institucional ao desenvolvimento deste estudo.
- Ao Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), por fornecer suporte tecnológico e de infraestrutura para o desenvolvimento da parte experimental do estudo.
- Ao Hospital Sanatório Partenon e seus funcionários, por terem nos possibilitado o desenvolvimento deste estudo nas dependências do hospital.
- À Dra Carla Jarcwieski, do Hospital Sanatório Partenon pelo apoio na seleção dos pacientes.
- À Dra Fernanda Queiroz Mello, obrigada por me mostrar os primeiros passos de avaliação econômica.
- À Dra Maria Lúcia Rosa Rossetti por ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver este estudo junto ao grupo do CDCT.
- As colegas farmacêuticas Cíntia Costi, Candice Michelon e Rúbia Rupenthal, e a bióloga Patrícia Cafrune, o meu carinho e a minha saudade dos momentos que passamos juntas, sem o suporte técnico e laboratorial de vocês, com suas idéias e sugestões este estudo, não teria passado de um projeto.
- À Dra Vera Treis Trindade constante estímulo com o seu conhecimento e sua vocação à docência.
- À Dra Rosa Dea Sperhackle, o meu carinho especial pela amizade e pelo apoio incondicional no desenvolvimento da parte experimental e teórica deste estudo.
- Ao Dr. Afrânio Kritski, agradeço a paciência durante a minha gestação, a disposição de trabalho, aos valiosos conhecimentos repassados, a confiança a mim destinada, ao apoio nas horas em que pensei que não seria possível chegar até aqui, mas principalmente gostaria de agradecer ao amigo com quem sempre pude contar.
- Aos meus pais, pela constante torcida.
- Ao João, pelo apoio e por compreensão.
- À Ana, por renovar minhas energias, no final de cada dia.
- A Deus que me proporciona, a cada dia, momentos como este!

Resumo

Objetivos: Avaliar o desempenho e o custo-efetividade de duas técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) *in house*: PCR dot-blot e o PCR utilizando a eletroforese em gel de agarose (PCR-AG) no diagnóstico de Tuberculose Pulmonar em pacientes infectados ou não pelo HIV .

Material e Métodos: Um estudo prospectivo foi conduzido (de Maio de 2003 a Maio de 2004) em um Hospital de Referência para TB/HIV. Escarros de 277 indivíduos com suspeita de Tuberculose Pulmonar (PTB) foram testados pelas técnicas de microscopia direta pela coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), cultura e pelas metodologias de PCR *in house* (PCR dot-blot e PCR-AG). A acurácia dos testes foi avaliada de acordo com o *status* de HIV, com o *status* de tratamento prévio ou não, e com a estimativa de probabilidade pré-teste feita pelos pneumologistas. O padrão ouro utilizado foi a cultura positiva combinada com a definição clínica de PTB (usando sintomas, fatores de risco e Raios-X). O custo efetividade foi expresso por: a) custo por correto caso diagnosticado de Tuberculose; b) custo por correto caso diagnosticado de Tuberculose e tratado incluindo tratamento de casos falsamente diagnosticados; c) custo por casos incorretamente diagnosticados e não tratados.

Resultados: Prevalência de PTB foi 46,2% (128/277); em HIV soropositivo (HIV⁺) foi de 54% (40/74). Em pacientes com baciloscopias negativas foi de 28,4% (43/151) e nos grupos com probabilidades pré-teste alta, intermediária e baixa foi de 67,4% (31/46); 24% (6/25) e 7,5% (6/80).

A sensibilidade e a especificidade do PCR dot-blot foi 74% (CI 95%; 66,1%-81,2%) e 85% (CI 95%; 78,8%-90,3%); do PCR-AG foi 43% (CI 95%; 34,5%-51,6%) e 76% (CI 95%; 69,2%-82,8%), respectivamente. Sensibilidades do PCR dot-blot (72% vs 75%; p=0,46) e PCR-AG (42% vs 43%; p=0,54) foi similar para HIV⁺ and HIV seronegativo (HIV⁻).

Em relação ao efeito da suspeita clínica no desempenho do PCR em pacientes com PTB e com a baciloscopia negativa, o PCR dot-blot combinado com alta probabilidade pré-teste de TB mostrou uma sensibilidade, Valor Preditivo Negativo (VPN) e Razão de Verossimilhança negativa (RV-) de 93%, 96% e 0,1, respectivamente.

Usando a estratégia de associar ZN a Cultura, a PCR-AG e PCR dot-blot. A ZN associada à Cultura mostrou o melhor desempenho com sensibilidade de 94% e VPN de 99%, e RV- de 0,07, seguida da ZN associado ao PCR dot-blot com sensibilidade de 90%, com VPN de 99% e uma RV- de 0,12. Não houve diferença significativa no desempenho do PCR em relação ao status de HIV.

Na análise de custo-efetividade os custos por correto caso diagnosticado de Tuberculose foram U\$1.462,00 , U\$1.296,00 e U\$1.136,00; os custos por correto caso diagnosticado de Tuberculose e tratado, incluindo tratamento de casos falsamente diagnosticados, foram de US\$1.608,00 para a estratégia do ZN associado ao PCR-dot-blot e de US\$2.359,00 para a estratégia de ZN associado a Cultura. Os custos por casos não diagnosticados que retornam aos serviços de saúde foram de US\$3.735,00 para a estratégia de ZN associado ao PCR-dot-blot e de US\$2.329,00 para a estratégia de ZN associada à Cultura.

Conclusão: Este estudo mostra que as técnicas de PCR *in house* podem oferecer uma melhora para o diagnóstico de exclusão de TB em pacientes com suspeita de TB atendidos em hospitais com alta prevalência de TB e HIV.

Abstract

Objective: To evaluate the performance and cost-effectiveness of two *in house* PCR (Polymerase Chain Reaction) techniques: PCR dot-blot methodology (PCR dot-blot) and PCR agarose gel electrophoresis (PCR-AG) for the diagnosis of Pulmonary Tuberculosis (PTB) in patients with or without HIV.

Methods: A prospective study was conducted (from May 2003 to May 2004) in a TB/HIV reference hospital. First sputum from 277 PTB patients suspects was tested by Ziehl-Neelsen direct microscopy staining (ZN), culture and *in house* PCR assays (PCR dot-blot and PCR-AG). The accuracy of tests was evaluated in according to HIV status, previous treatment and the estimative of pretest probability (PP) of PTB performed by chest physicians. Gold standard was the culture positive combined with the definition of clinical PTB (based on symptoms, risk factors and chest X- Ray). The cost effectiveness was expressed as: a) cost per correctly diagnosed case of PTB; b) cost per case correctly diagnosed and treated, including treatment of falsely diagnosed cases; c) cost per case incorrectly diagnosed and non treated.

Results: The prevalence of PTB was 46% (128/277); in HIV Seropositive (HIV⁺) was 54% (40/74). In patients ZN negative was 28.% (43/151) and in the groups with high, intermediary and low PP was 67.4% (31/46); 24% (6/25) and 7.5% (6/80).

The Sensitivity and Specificity of PCR dot-blot were 74% (CI 95%; 66.1%-81.2%) and 85% (CI 95%; 78.8%-90.3%); of PCR-AG were 43% (CI 95%; 34.5%-51.6%) and 76% (CI 95%; 69.2%-82.8%), respectively. Sensitivities of PCR dot-blot (72% vs 75%; p=0.46) and PCR-AG (42% vs 43%; p=0.54) were similar for HIV⁺ and HIV Seronegative (HIV⁻).

In relation to the effect of clinical suspicion on the performance of PCR in patients with PTB and ZN negative, the PCR dot-blot associate to high pretest probability of PTB showed sensitivity, Negative Predictive Value (NPV) and negative likelihood ratio (LR-) of 93%, 96% and 0.1, respectively.

Using the strategy of associate ZN with Culture and PCR methods (PCR-AG and PCR dot-blot), the ZN plus Culture had the highest performance: Sensitivity of 94%, VPN of 99% and LR- of 0.07. ZN plus PCR dot-blot also had a good performance with sensitivity of 90%, VPN of 99% and LR- of 0.12. There was not statistical difference on the performance of PCR in relation to HIV status.

Costs per correctly diagnosed case were U\$1,462, U\$1,296 and U\$1,136 for ZN plus culture, ZN plus PCR-AG and ZN plus PCR dot-blot, respectively. The cost per case correctly diagnosed and treated, including treatment of falsely diagnosed cases, was US\$1,608 for ZN plus PCR dot-blot and US\$2,359 for ZN plus culture. Cost of the return of all false negatives to health service was US\$3,735 for ZN plus PCR dot-blot and US\$2,329 for ZN plus Culture.

Conclusion: This study shows that *in house* PCR may offer an improvement for ruling out TB diagnosis for PTB suspects assisted at hospitals with a high prevalence of TB and HIV.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	XI
Lista de Figuras	XII
Lista de Tabelas.....	XIII
1. Introdução	1
1.1 Tuberculose	1
1.2 Epidemiologia da Tuberculose.....	2
1.3 O agente etiológico da Tuberculose	5
1.3.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.3.2 Genoma do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
1.4 Transmissão	6
1.5 Imunopatogenia	8
1.6 Tratamento.....	10
1.7 Manifestações Clínicas da TB.....	12
1.7.1 Tuberculose Pulmonar	13
1.8 Tuberculose e HIV	14
1.9 Métodos de Diagnóstico Laboratoriais da Tuberculose	14
1.9.1 Métodos Convencionais para diagnóstico de TB pulmonar	16
1.9.1.1 Baciloscopia.....	16
1.9.1.2 Cultura	17
1.9.1.3 Métodos Radiológicos.....	18
1.10 Novos Métodos para o diagnóstico de TB pulmonar	18
1.10.1 Métodos de Biologia Molecular Comerciais	19
1.10.2 Métodos de Biologia Molecular <i>in house</i>	22
1.11 Análise de Custo Efetividade	25
2. Objetivos.....	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. Material e Métodos	29
3.1 Pacientes	29

3.2. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do Dna de <i>Mycobaterium tuberculosis</i>	33
3.3 Logística da análise e métodos de PCR <i>in house</i> avaliados.....	29
3.3.1 Logística da avaliação	29
3.3.1.1 Fluxograma da logística operacional de recrutamento de pacientes e coleta de dados.....	30
3.3.1.2 Fluxograma das diferentes fases de análise da técnica de PCR <i>in house</i> desenvolvidas	31
3.3.2 Métodos de PCR <i>in house</i> analisados	32
3.3.2.1 Região selecionada para amplificação por PCR.....	32
3.3.2.2 PCR <i>in house</i> com detecção em gel de agarose (PCR- AG).....	35
3.3.2.3 PCR <i>in house</i> colorimétrico (PCR dot-blot).....	35
4. Resultados.....	38
4.1 Artigo 1	39
4.2 Artigo 2	69
4.3 Artigo 3	89
4.4 Artigo 4	116
5 Discussão	143
5.1 Dados Epidemiológicos da população estudada	143
5.2 Análise de Sinais e Sintomas Clínicos associados em pacientes infectados ou não por HIV.....	143
5.3 Sensibilidades e Especificidades das técnicas de PCR <i>in house</i> para o diagnóstico de TB pulmonar	144
5.4 Dificuldades no diagnóstico de TB pulmonar em pacientes infectados por HIV	147
5.5 Análise da Suspeita Clínica do Médico (probabilidades pré-teste) de diagnóstico de Tuberculose Pulmonar.....	147
5.6 O Impacto da Associação das técnicas de PCR <i>in house</i> com a técnica de microscopia direta (baciloscopia) para o diagnóstico de TB pulmonar	148
5.7 O Impacto das diferentes taxas de prevalência de Tuberculose Pulmonar no desempenho da técnica de PCR <i>in house</i> (PCR dot-blot) utilizada em	

associação com a técnica de microscopia direta (baciloscopia) para o diagnóstico de TB pulmonar	151
5.8 Dificuldades no diagnóstico de TB pulmonar em pacientes com baciloscopia negativa (ZN negativo).....	152
5.9 O Impacto da suspeita Clínica do médico na avaliação do desempenho da técnicas de PCR <i>in house</i> no diagnóstico de TB pulmonar	153
5.10 Falsos positivos e negativos nas técnicas de PCR <i>in house</i>	154
5.11 Análise de custo-efetividade das técnicas de PCR <i>in house</i>	157
5.12 Recomendações para a utilização de testes moleculares em rotina	160
6 Conclusões	163
7 Perspectivas	165
8 Referências.....	167
9 Anexos	182
9.1 Anexo 1: Termo de consentimento	182
9.2 Anexo 2: Questionário Clínico.....	184
9.3 Anexo 3: Questionário aplicado aos pacientes	185
9.4 Anexo 4: Parecer do comitê de ética	188
9.5 Anexo 5: Instruções das revistas para os autores	189
9.5.1 Brazilian Journal of Microbiology	189
9.5.2 Journal of Clinical Laboratory Analysis	192
9.5.3 The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease	194

Lista de Abreviaturas

AAN – Amplificação de ácido Nucleico

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BAAR- Bacilo álcool ácido resistente

CDCT- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DOTS- Tratamento supervisionado para Tuberculose

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EP- Especificidade

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

HSP – Hospital Sanatório Partenon

MDR- Multi-Droga Resistente

MOTT –Outro Mycobacterium que não Tuberculosis

MS-Ministério da Saúde

MTB- *Mycobacterium tuberculosis*

PCR- Reação em cadeia da Polimerase

PP- Probabilidade Pré- teste

PPD- Prova Tuberculínica

RV- Razão de Verossimilhança

RV⁺ - Razão de Verossimilhança Positiva

RV⁻ - Razão de Verossimilhança Negativa

SE- Sensibilidade

TB –Tuberculose

TBP- Tuberculose Pulmonar

VPN- Valor Preditivo Negativo

VPP- Valor Preditivo Positivo

ZN- Ziehl Nielsen

ZN negativo – Baciloscopia por Ziehl Nielsen Negativa

ZN positivo – Baciloscopia por Ziehl Nielsen Positiva

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma da logística operacional de recrutamento de pacientes e coleta de dados.....	30
Figura 2. Fluxograma das diferentes fases de análise da técnica de PCR <i>in house</i> desenvolvidas	31
Figura 3. Esquema representativo de uma região do elemento de inserção IS6110 mostrando a localização dos <i>primers</i> utilizados no estudo.....	323
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (2%).	344
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose (2%).	355
Figura 6. Representação esquemática do procedimento Dot-blot colorimétrico.	366
Figura 7. PCR dot-blot, realizado com os produtos da PCR obtidos de diferentes amostras de escarro espontâneo.....	377
Figura 8. Comprovação da submissão do artigo	699
Figura 9. Comprovação do resumo na PUBMED	899
Figura 10. Comprovação da submissão do artigo.....	1166

Lista de Tabelas

Tabela 1. Testes moleculares para detecção de <i>M. tuberculosis</i>	21
Tabela 2. Técnica de detecção, limite de detecção, sensibilidade e especificidade da PCR obtidos por diferentes métodos de preparação da amostra.....	24
Tabela 3. Primer, seqüências, regiões, posições no genoma de <i>M. tuberculosis</i> e tamanho do fragmento de DNA amplificado referentes à sonda utilizada na hibridização e ao DNA amplificado das amostras clínicas.....	33

1. Introdução

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB), endêmica na Antiguidade permaneceu como uma enfermidade sem importância durante o período feudal no ocidente, até o aumento de sua ocorrência no período da revolução industrial, no século XVIII. Durante este século e no início do século XX, o sofrimento e o confinamento proporcionado pela doença tornavam as almas tristes e poéticas. Nesta época, associou-se à tuberculose a uma "doença romântica", idealizada nas obras literárias e artísticas ao estilo do romantismo (Bates, 1980).

Em 1882, Robert Koch descobre o agente causador da TB, o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), sendo um marco para o conhecimento da enfermidade na área diagnóstica e na área da terapêutica. A descoberta do tratamento antimicrobiano, específico a partir de 1940, alterou mundialmente o perfil epidemiológico da TB, com a queda da mortalidade. Entretanto desde os anos 80, vem ocorrendo um aumento da mortalidade associada à TB, principalmente em grandes centros urbanos com elevada prevalência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e TB, onde normalmente, o sistema de saúde está mais desestruturado e é maior a taxa de TB multirresistente (MDR), principalmente em instituições como hospitais e prisões (WHO, 2005).

Com o advento do HIV/ "Acquired Immune Deficiency Syndrome" (AIDS), tornou-se mais difícil o diagnóstico da TB, em razão da maior ocorrência de formas clínico-radiológicas atípicas (Schijman, et al. 2004). Na fase avançada de

imunossupressão (AIDS), os sítios extrapulmonares são os mais afetados, isoladamente ou em associação com as formas pulmonares. O rendimento da baciloscopia utilizada para diagnóstico é inferior, sendo a proporção de casos com baciloscopia positiva entre 20% a 40%, mantendo-se a cultura para micobactérias com rendimento próximo daquele observado entre pacientes não infectados pelo HIV (Sharma, et al. 2005). Diante de tal situação, organizações internacionais passaram a priorizar o desenvolvimento e avaliação de novos testes diagnósticos para a TB, que possam ser úteis em regiões de elevada prevalência de *M.tuberculosis* e HIV (Walker, et al. 2000). Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, em pacientes atendidos nos Centros Municipais de Saúde, observou-se uma maior ocorrência de TB pulmonar com baciloscopia negativa naqueles infectados pelo HIV. Tais dados indicam a necessidade de viabilizar a cultura para micobactéria nestes pacientes e também, priorizar o desenvolvimento e a análise da aplicabilidade de novos métodos para o diagnóstico rápido da TB pulmonar, principalmente nos grandes centros urbanos (Kritski, 2003).

1.2 Epidemiologia da Tuberculose

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2007, o maior número de casos novos ocorreu na região do sudeste asiático, com uma taxa de incidência de 52 casos a cada 100.000 habitantes. Entretanto, a incidência em países africanos é quase 50% maior àquela da região de Sudeste Asiático (em torno de 75 casos a cada 100 000 habitantes (WHO, 2006). A OMS estima que existam no mundo, anualmente, oito milhões de novos casos de TB

resultando em cerca de dois milhões de mortes por ano, sendo estimado um crescimento anual de 0,6% (Wang, 1999; WHO, 2006). Além disso, estima-se que cerca de 1,7 bilhões de indivíduos em todo o mundo estejam infectados pelo bacilo da TB, correspondendo a 30% da população global (Jeffrey, 2000). Nos países desenvolvidos, a cada ano, cerca de 60 mil mortes são devidas à TB e mais de 500 mil novos casos são descobertos (WHO, 2006). Nesses países, a TB é mais freqüente entre idosos, minorias étnicas e imigrantes estrangeiros.

No Brasil, com uma população de aproximadamente 182 milhões, estima-se que, do total da população, 35 a 45 milhões de pessoas estejam infectadas pelo bacilo da TB, e aproximadamente, ocorrem em torno de 80 a 90 mil casos novos (Brasil, 2005). Com uma incidência de 44 casos por 100000 habitantes e uma taxa de mortalidade de 2,8 (Brasil, 2005). Nos últimos anos, o Ministério da Saúde passou a considerar a TB como um problema prioritário, pois o país ocupa o 14º lugar entre os 23 países em desenvolvimento responsáveis por 80% dos casos mundiais da doença (Dye, et al. 2002; Brasil, 2005; WHO 2006).

Com relação ao tratamento para TB no Brasil, em torno de 72% dos casos notificados recebem alta por cura, com abandono de 12%, 7% de óbitos, e 9% em falência terapêutica, distantes, portanto, das metas internacionais estabelecidas pela OMS e pactuadas pelo Ministério da Saúde de curar 85% dos casos estimados. (Picon et al. 2002; Mello, et al. 2003; Tuberculose, 2004), sendo que, em grandes centros urbanos, onde é elevada a taxa de HIV, o

abandono do tratamento anti-TB pode chegar a 30% (Mello, et al. 2003; ECE/CGVS, 2005).

O aumento nas taxas de incidência da TB ocorre devido a alguns fatores, como sistemas de saúde e programas de controle da TB deficitários e de péssima qualidade; elevada ocorrência de TB entre as populações de baixa renda; co-infecção pelo HIV; e surgimento de linhagens resistentes aos fármacos utilizados no tratamento (Suffys, et al. 1997; Dalcomo, 1999).

No Brasil o aumento do número de linhagens MDR (resistentes a, pelo menos, rifampicina e isoniazida), com taxa de 0.9% entre os novos casos (WHO 2006) tem causado enorme preocupação, pois contribui para aumentar a mortalidade de TB, principalmente diante do cenário da infecção pelo HIV (Dye and Williams 2000; Rossetti et al., 2002).

No Rio Grande do Sul, no ano de 2004, a taxa de incidência da TB foi de 47 casos a cada 100.000 habitantes, tendo sido notificados 5.037 casos da doença, com uma população de 10.726.408 habitantes (Brasil, 2005).

Taxas alarmantes são encontradas em grandes centros urbanos com altos índices populacionais e elevada taxa de infecção pelo HIV e baixos níveis sócio-econômicos, como na região metropolitana de Porto Alegre.

Em Porto Alegre em 2004, a Equipe de Controle Epidemiológico (ECE), responsável pela Vigilância Epidemiológica da TB, registrou 1432 casos novos de TB, sendo que 29% desses casos foram diagnosticados durante a internação

hospitalar e 71% nos ambulatórios de referência. Em relação a co-infecção HIV/TB 420 casos novos foram diagnosticados (ECE/CGVS, 2005).

A estratégia de controle da TB tem sido elaborada por programas governamentais que primam pelo diagnóstico e tratamento dos casos de TB o mais rápido possível, a fim de interromper a transmissão e evitar a difusão da doença. Entretanto, é necessário um planejamento de controle de TB que contemple um olhar sob as variações de tendência relativas à epidemia do HIV/AIDS, e à multiresistência das drogas utilizadas no tratamento de TB (Tuberculose, 2004). No Brasil, é fundamental a análise destas situações, pois a taxa de 17% para co-infecção de HIV/TB e a taxa de multiresistência de 0,9%, evidenciam a importância da análise destas situações no planejamento dos programas de Controle de Tuberculose (WHO, 2006).

1.3 O agente etiológico da Tuberculose

1.3.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis, pertencente à ordem dos *Actinomycetales*, à família *Mycobacteriaceae*, é um dos componentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, juntamente com *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. No Brasil, o principal agente causal da TB pulmonar é o *M. tuberculosis*, sendo raros os casos de TB causados por outras espécies do complexo. Os bacilos do complexo MTB possuem alto conteúdo lipídico na parede celular, podendo atingir até 40% do

peso seco da célula. Os bacilos são resistentes à ação de agentes químicos, mas sensíveis a agentes físicos, como radiação ultravioleta e calor (Kritski, 2000)

As micobactérias são álcool-ácido resistente em reações tintoriais, em sua grande maioria de crescimento lento, com um tempo de geração de aproximadamente 15 a 20 horas, dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e pH do meio. As micobactérias são aeróbias, não formadoras de esporos e não possuem motilidade. A morfologia das colônias varia entre às espécies, apresentando aspecto do liso ao rugoso, e pigmentado ou não pigmentado. A temperatura de crescimento também varia entre as espécies, de 30°C a 45°C (Murray, 1999).

1.3.2 Genoma do *Mycobacterium tuberculosis*

Em 1998, o genoma da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* foi completamente seqüenciado (Cole and Barrell, 1998). O genoma desse microorganismo é composto de 4.411.529 pares de bases (pb), contém em torno de 4.000 genes e possui um conteúdo de GC de 65,6%. Seu genoma possui seqüências de DNA repetitivo, particularmente seqüências de inserção (IS). Foram descritos 56 elementos de inserção. O elemento IS6110, membro da família IS3, não é somente o mais abundante como também o melhor caracterizado, sendo que o número de cópias varia de linhagem para linhagem de cepas analisadas (Cole and Barrell, 1998; Camus et al. 2002).

1.4 Transmissão

A tuberculose é transmitida de pessoa para pessoa através do ar (Edwards et al. 1986). As formas mais freqüentes de contágio são a fala, o espirro e, principalmente, a tosse (ATS, 2000). As partículas contagiantes (núcleos de Wells), com bacilos em suspensão no ar, alcançam os alvéolos e apresentam um tamanho de 5 a 10 μm (Wells, 1948; Kritski, 2000). Tais partículas, com um ou dois bacilos viáveis, podem permanecer suspensas no ar por várias horas. Chegando aos alvéolos, são fagocitadas pelos macrófagos alveolares e então iniciam a multiplicação. Apenas 1% dos bacilos sobrevivem por algumas horas nas gotículas suspensas, desde que não estejam expostos à ventilação e à luz solar (Kritski, 2000).

As características dos focos de contágio (pacientes com TB pulmonar e escarro positivo na baciloscopia: bacilíferos), dos contatos intra-domiciliares ou institucionais, bem como o ambiente, a maneira como ocorrem suas relações e o tempo de exposição, interferem na transmissão da TB. Portanto, é consenso que a transmissão do MTB é determinada por alguns fatores: 1) o número de organismos expelidos no ar; 2) a concentração de organismos no ar determinado pelo volume do espaço físico ambiente e a ventilação promovida pelo paciente; 3) o tempo de exposição em que a pessoa respira o ar contaminado; e 4) o estado imune do indivíduo exposto (ATS, 2000).

Calcula-se que, numa determinada população, uma pessoa bacilífera infecte de 10 a 15 pessoas por ano, com as quais tem contato. O risco de contágio de contatos intra-domiciliares ou institucionais é de 5% a 20%, e de contatos casuais de 0,2% a 2% (Kritski, 2000). Até pouco tempo a principal

ferramenta no diagnóstico e o monitoramento do paciente com TB pulmonar era a baciloscopia positiva. Entretanto, com o uso de tipagem molecular tem sido possível demonstrar que mesmo os pacientes com baciloscopia negativa e cultura positiva são responsáveis por 17 a 20% da transmissão da TB em determinada região, principalmente em grandes centros urbanos com elevada taxa de tuberculose associada a outras co-morbidades, como a infecção pelo HIV (Behr et al., 1999). Tais dados têm sinalizado os pesquisadores e gestores de políticas públicas de que se torna necessário identificar outras técnicas de diagnóstico rápido de TB, mais sensíveis que a baciloscopia e no mínimo similares à cultura de micobactérias para ser utilizada como uma nova ferramenta do controle de TB, nestas regiões.

1.5 Imunopatogenia

Na infecção inicial, quando a micobactéria penetra no pulmão, no alvéolo, de um indivíduo após ser expectorada em minúsculas partículas por um paciente bacilífero, esta é inicialmente fagocitada por um macrófago alveolar, e posteriormente os bacilos sofrem a fagocitose pela ação dos neutrófilos. Se o processo de resposta imunológica (fagocitose- mediada por células) for ineficiente, ocorre um processo de interação celular entre os macrófagos alveolares e os linfócitos T (CD4+), através da liberação de citocinas, com o objetivo de quimiotaxia celular, e resposta imunológica humoral (produção de anticorpos) (Kritski, 2000).

Os macrófagos fagocitam os bacilos e parte destes são destruídos, mas um contingente expressivo permanece vivo. Os bacilos remanescentes se

multiplicam dentro dos fagossomos, no citoplasma do macrófago, ou na cavidade alveolar (Bates, 1980). O bacilo cresce lentamente, dividindo-se aproximadamente a cada 25 a 32 horas. O microrganismo cresce por 2 a 12 semanas até alcançar um crescimento na potência de 10^3 a 10^4 , já suficiente para provocar uma resposta imune celular específica (ATS, 2000).

O risco de infecção ativa pelo bacilo é elevado, pois em cerca de 50% dos expostos, o bacilo alcança os alvéolos e promove a infecção ativa. A infecção é identificada pela prova tuberculínica positiva. Entretanto, num período de 2 anos, o risco de desenvolvimento de TB ativa entre pessoas saudáveis infectadas é de 5% a 10% (Styblo, 1991; ATS, 2000). Nos demais casos, o bacilo fica em estado de latência, podendo reativar posteriormente no decorrer da vida do indivíduo. A evolução para a doença depende de múltiplos fatores relacionados com o microorganismo (virulência) e com o hospedeiro (imunidade, fatores genéticos, existência de outras doenças). Essa evolução para a TB ativa depende do tipo de infecção que está ocorrendo; se o indivíduo está sendo infectado pela primeira vez (primo-infecção ou infecção primária) ou sendo reinfestado (reinfecção exógena). Estima-se que a ocorrência de TB ativa é mais freqüente principalmente em crianças, idosos e/ou imunodeprimidos. Entretanto, os indivíduos previamente infectados pelo bacilo da TB, com prova tuberculínica positiva, apesar de uma defesa imune anterior, caso sejam expostos continuamente à TB, podem adoecer. Além disso, os bacilos latentes poderão desenvolver TB ativa mesmo muitos anos depois (reativação endógena) (Bloom and Murray, 1992)

Indivíduos infectados pelo HIV, especialmente aqueles com baixa contagem de linfócitos T (CD4+) (menos de 100 células por mm³), desenvolvem a TB rapidamente após serem infectados pelo *M. tuberculosis*, e entre 10% a 25% destes podem desenvolver a doença nos primeiros 2 anos. Por outro lado, indivíduos que possuem uma infecção latente com *M. tuberculosis* (não tratada) e adquirem a infecção com HIV poderão desenvolver tuberculose em uma taxa de aproximadamente 5% a 10% ao ano (Conde et al., 1999; ATS, 2000). Tais dados sinalizam a necessidade do rápido diagnóstico de TB pulmonar em instituições (hospitais ou prisões) e em nível domiciliar, onde indivíduos infectados pelo HIV estejam convivendo no mesmo ambiente.

1.6 Tratamento

A tuberculose é uma doença grave, porém curável em, praticamente, 95% dos casos novos, desde que, uma vez diagnosticada a doença, seja empregado o tratamento antimicrobiano adequado. A associação medicamentosa adequada, as doses corretas, a supervisão da tomada dos medicamentos e o uso por tempo suficiente (em média 6 a 9 meses) são medidas importantes para evitar a resistência e a persistência bacteriana, assim como medidas que favoreçam a adesão ao tratamento (Tuberculose, 2004).

Os antimicrobianos recomendados pela OMS e mais comumente usados para o tratamento da TB em países em desenvolvimento nas Américas são: a estreptomicina, etambutol, etionamida, e pirazinamida, além da Isoniazida e Rifampicina.

Desde 1979, o Ministério da Saúde padroniza dois esquemas para tratamento, um de primeira linha para os casos virgens de tratamento, o Esquema I, com 2 meses de rifampicina, isoniazida e pirazinamida e 4 meses de rifampicina e isoniazida e, um de reserva ou de segunda linha, o Esquema III, com 3 meses de estreptomicina, pirazinamida, etambutol e etionamida e 9 meses de etambutol e etionamida, indicado para pacientes com falência ao E-I. Para casos de meningocéfalite isolada ou associada a outras formas, é proposto um esquema especial, o Esquema II, com 2 meses de rifampicina, isoniazida e pirazinamida e 7 meses de rifampicina e isoniazida, acrescido de corticóides por um período de um a 4 meses, no início do tratamento (Tuberculose, 2004)

A resistência aos fármacos é definida como a diminuição da sensibilidade *in vitro* do *M. tuberculosis* a uma ou mais drogas utilizadas para combater a doença (Silva et al., 2003). O aumento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos (MDR) vem se tornando um dos principais problemas no tratamento e combate da TB em nível mundial (Silva et al., 2003). Tais linhagens são prevalentes em determinadas áreas geográficas ou populações (hospitais, prisões), causando importantes surtos (Bloom and Murray 1992). Isso é ainda mais grave em pacientes com AIDS, pois como foi mencionado anteriormente, o risco à infecção seguida de adoecimento por TB nestes indivíduos é extremamente elevado. Além disso, nestes ambientes de elevada prevalência de MTB-MDR, enquanto o diagnóstico de TB multiresistente não for realizado precocemente e um tratamento adequado for instituído, a transmissão não será interrompida (Haas and Des Prez 1994). Pacientes com Tuberculose causada

por MDR devem ser tratados com regimes terapêuticos contendo antituberculostáticos de segunda linha. Pelo menos quatro drogas a que os organismos são suscetíveis devem ser usadas, e o tratamento deve ser dado pelo período mínimo de 18 meses, medidas que assegurem a aderência ao tratamento devem ser seguidas (Tuberculose, 2006).

1.7 Manifestações Clínicas da TB

A TB é uma doença crônica ou subaguda, podendo apresentar períodos de remissão, retardando o paciente na busca de serviço médico especializado. Esta conduta pode agravar ainda mais seu estado clínico e pode aumentar o tempo de transmissão do bacilo na população. As manifestações clínicas da TB variam muito e dependem de diversos fatores, inerentes ao microrganismo e ao hospedeiro (imunodeficiência, desnutrição, etc), bem como as suas interações, as quais influenciam diretamente na apresentação clínica da doença (ATS, 2000).

Como a TB é normalmente adquirida por inalação do bacilo, a localização inicial é no pulmão. Posteriormente, pode ocorrer uma disseminação para outros órgãos, causando o que é chamado de tuberculose extrapulmonar (óssea, meningoencefálica, renal, genitourinária, etc.). Como citado anteriormente, após o advento da AIDS vários estudos têm descrito menor apresentação da forma pulmonar da TB (38%) entre pacientes com infecção por HIV na fase avançada e a ocorrência de lesões pulmonares associadas a lesões extrapulmonares em 32% (ATS, 2000; Kritski and Ruffino-Netto, 2000). Entre as formas

extrapulmonares isoladas, a mais freqüente é a forma ganglionar. Nos pacientes com TB pulmonar e infectados pelo HIV, principalmente naqueles na fase avançada de sua imunodepressão, é menos comum a tosse produtiva e hemoptise e mais freqüente a dispnéia. Estas características clínicas dificultam o diagnóstico clínico e a obtenção de amostras clínicas para exame baciloscópico (Kritski 2000). O *M. tuberculosis* pode determinar lesões em outros órgãos, além do pulmão, entre estes o coração (preferencialmente no pericárdio), a pele, o peritônio, os órgãos genitais, o intestino, as glândulas adrenais, o olho e a laringe.

1.7.1 Tuberculose Pulmonar

Os sintomas mais comuns de Tuberculose Pulmonar são tosse persistente por mais de duas ou três semanas, freqüentemente associada a sintomas sistêmicos como febre, sudorese e emagrecimento. Adicionalmente, outros sintomas como linfadenopatia, em conformidade com tuberculose extrapulmonar, pode ser notado, especialmente em pacientes com infecção por HIV. Todos estes sintomas e sinais são inespecíficos e podem estar presentes em outras enfermidades pulmonares, incluindo doenças agudas do trato respiratório, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica. Tradicionalmente, a tosse persistente tem servido como critério para a definição de suspeita de tuberculose e é usada nacional e internacionalmente, particularmente em áreas de moderada a alta prevalência de Tuberculose (Tuberculose, 2006).

Inicialmente, nos pacientes não imunodeprimidos, os sintomas respiratórios usualmente referidos são tosse acompanhada de expectoração

mucopurulenta, às vezes com sangue e dor torácica. Dispnéia é pouco freqüente, ocorrendo apenas nos pacientes com lesões pulmonares mais avançadas e de longa duração. Rouquidão normalmente caracteriza comprometimento da laringe e requer confirmação pelo elevado risco de transmissão aos contatos (Kritski, 2000).

1.8 Tuberculose e HIV

A infecção com HIV aumenta a probabilidade da progressão da infecção com *M. tuberculosis* e as manifestações clínicas da doença. A infecção do HIV também dificulta o diagnóstico de Tuberculose Pulmonar, uma vez que, em comparação com os não infectados pelo HIV, pacientes infectados apresentam uma menor sensibilidade de detecção pela microscopia direta. Além disto, estudos mostram que as características radiográficas na fase avançada da doença são atípicas. Portanto, o conhecimento do *status* do HIV, incluindo uma busca de indicadores que sugiram a presença da infecção de HIV, de um paciente é fundamental para o manejo diagnóstico e clínico do paciente, particularmente em áreas com prevalência elevada de HIV/TB (Kivihya-Ndugga et al., 2004; Sharma et al., 2005; van Cleeff et al., 2005; Keshinro and Diul, 2006; WHO, 2006)

1.9 Métodos de Diagnóstico Laboratorial da Tuberculose

Reconhecidamente, a pesquisa bacteriológica é o método prioritário, quer para o diagnóstico, quer para o controle do tratamento da Tuberculose, além de permitir a identificação da principal fonte de transmissão da infecção: o paciente

bacilífero. O diagnóstico microbiológico contempla a detecção e isolamento da micobactéria, a identificação da cepa e/ou do complexo isolado, e a determinação da sensibilidade do microorganismo aos antituberculostáticos. O estudo radiológico convencional torácico é indicado sempre, como método auxiliar para os sintomáticos respiratórios negativos à baciloscopia do escarro espontâneo e para os indivíduos em contato com pacientes bacilíferos, de todas as idades, intradomiciliares ou institucionais, com ou sem sintomatologia respiratória, suspeitos de TB extrapulmonar e infectados por HIV ou com AIDS. A prova Tuberculínica (PPD) também faz parte dos métodos de abordagem diagnóstica e é indicada como método de triagem de hipersensibilidade. Outros métodos são incluídos no diagnóstico de TB pulmonar de acordo com a complexidade do caso, como avaliação do escarro induzido, broncoscopia, biópsia transbrônquica, tomografia de tórax, técnicas de biologia molecular. Os testes sorológicos não apresentaram sensibilidade e especificidade que justifiquem o uso rotineiro na investigação clínica da TB (ATS, 2000; Kritski, 2000; Tuberculose, 2004). A falta de um diagnóstico rápido e confiável para a TB constitui um sério problema de saúde pública. Recentemente, em estudos realizados em países africanos de elevada prevalência de infecção pelo HIV, a ocorrência de TB pulmonar paucibacilar (com baciloscopia negativa/cultura positiva) foi associada à menor sobrevida, mesmo em pacientes submetidos ao tratamento supervisionado (DOTS) (Hargreaves et al., 2001).

A detecção da doença na sua fase inicial é de vital importância para o início efetivo do tratamento, bem como para evitar a utilização inadequada de

medicamentos potencialmente tóxicos. O diagnóstico clínico precoce da doença se faz bastante complicado, sobretudo quando a TB ocorre associada a outras enfermidades (infecção pelo HIV, neoplasias malignas, pós-transplantes, etc), quando então o diagnóstico laboratorial é de extrema importância.

1.9.1 Métodos Convencionais para diagnóstico de TB pulmonar

1.9.1.1 Baciloscopia

A baciloscopia consiste na visualização microscópica do bacilo da TB após fixação em lâmina e coloração específica do material a ser analisado. O método de coloração específico para micobactéria usado na rotina do diagnóstico é o Ziehl-Nielsen (ZN) (ATS, 2000; Tuberculose, 2004). Este método baseia-se na capacidade das micobactérias em reter a fucsina após coloração quando se apresentam como bastonetes, ligeiramente delgados, corados em vermelho com fundo azul, que não descora com álcool-ácido, sendo por isso referidas como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Bloom and Murray, 1992).

A metodologia é simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo. A baciloscopia disponibiliza uma ampla cobertura diagnóstica, possibilitando a identificação da principal fonte de infecção (pacientes com baciloscopia positiva: bacilíferos), o que permite a pronta atuação na interrupção da cadeia de transmissão. No entanto, é pouco sensível, detectando apenas 60% dos materiais clínicos com crescimento em cultura, e não é específica, uma vez que não é possível distinguir entre as espécies de micobactérias descritas,

necessitando identificação da micobactéria posteriormente (Styblo, 1991). A sensibilidade do método depende da presença de 10.000 organismos por mL de amostra para um resultado positivo (Kritski, 2000). Isto significa que um esfregaço negativo não exclui um caso de TB. Esse fato é ainda mais notável quando a infecção ocorre em outros órgãos (pleura, meninges), onde um número ainda menor de organismos pode causar manifestações clínicas.

1.9.1.2 Cultura

O isolamento de micobactérias em meio de cultura é um método mais sensível que a baciloscopia, tanto para TB pulmonares como para TB extrapulmonares. A cultura pode detectar de 10 a 100 bacilos por mL de material (Kritski, 2000). Um diagnóstico pode ser realizado pela cultura, mesmo nos casos em que o número de bacilos é insuficiente para uma baciloscopia positiva.

Tradicionalmente, o isolamento através da cultura tem sido realizado em meios sólidos e/ou líquidos, tais como o meio de Löwenstein-Jensen, o meio sólido de Ogawa, e aqueles que utilizam o ágar, como o meio Middlebrook (7H-10 e 7H-11). (Kudoh and Kudoh, 1974). O crescimento só é detectável 3 a 6 semanas após a inoculação. Quando os espécimes como escarro, urina e secreção de cavidade aberta são utilizados para o cultivo, estes materiais são normalmente contaminados, sendo necessário eliminar a flora associada, que contamina o meio e impede a multiplicação dos bacilos. O método de descontaminação mais utilizado é o tratamento com hidróxido de sódio e/ou N-acetil-L-cisteína/NaOH (Kritski, 2000). A sensibilidade e especificidade da cultura

variam consideravelmente com o material analisado, respectivamente de 30% a 96% e de 98% a 100%, sendo melhor em escarro (Bloom and Murray, 1992; ATS, 2000).

1.9.1.3 Métodos Radiológicos

A TB apresenta opacidades radiológicas na maioria dos casos, constituindo um relevante instrumento diagnóstico. As manifestações radiológicas da TB associadas à infecção por HIV dependem do nível de imunodepressão e do tempo da doença. Assim, pacientes com imunidade celular íntegra apresentam lesões semelhantes às da pessoa não infectada e entre os pacientes com grave imunossupressão, 10 a 20% apresentam radiografias normais (Tuberculose, 2004). Achados radiológicos atípicos são encontrados na fase mais avançada da doença, com maior frequência de imagens difusas, não cavitárias, com linfonomegalia hilar e/ou mediastinal, e em 10% dos casos, sem alteração no radiograma torácico (Kritski, 2000; Tuberculose, 2004).

1.10 Novos Métodos para o diagnóstico de TB pulmonar

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (AAN), tendo como alvo seqüências específicas de microorganismos, surgiram como promissores instrumentos para o diagnóstico de TB sensível ou resistente. Entre estas, as mais utilizadas para o diagnóstico de TB são as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação mediada por transcrição, amplificação por

deslocamento de fita e reação em cadeia da ligase (Catanzaro et al., 2000; Ellingson et al., 2000; Dziadek et al., 2001; Cleary et al., 2003)

1.10.1 Métodos de Biologia Molecular Comerciais

Apesar de apresentarem em média elevadas sensibilidades e especificidades em amostras com baciloscopia positiva, o seu rendimento diagnóstico é inferior nas amostras com baciloscopia negativa. Até o momento, existem alguns testes disponíveis comercialmente: AMTD® e o EMTD®- nova geração do AMTD® (Gen- Probe Inc, San Diego, CA); Amplicor® e Cobas Amplicor® (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) – o último uma geração mais completa; LCx® (Abbott Laboratories) e SDA® (Biosciences, Sparks, Md). Entretanto, apenas o AMTD®, o Amplicor® e o EMTD® foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Inicialmente, os testes Amplicor® e o EMTD® foram aprovados somente para a utilização em amostras clínicas pulmonares com baciloscopia positiva, mas recentemente, EMTD® foi aprovado para a utilização em amostras de pacientes suspeitos de TB pulmonar com baciloscopia positiva e negativa. Ambos os testes tem seu uso aprovado no Brasil (Soini et al., 1996; ATS, 2000; Sarmiento et al. 2003).

A sensibilidade e especificidade de ambos os testes têm sido analisados em diferentes estudos (Gamboa et al., 1997; Yuen et al., 1997; Gamboa et al. 1998; Scarparo et al., 2000; Shibuya et al., 2000; Al Zahrani et al., 2001; Mitarai et al., 2001; Mitarai et al., 2001; Woods, 2001; Fegou et al., 2005; Goessens et al., 2005; Tarhan et al., 2005; van Cleeff et al., 2005). A Tabela 1, adaptada de

Drobniewski et al. (2003), mostra uma comparação entre alguns estudos de sensibilidade e especificidade.

Tabela 1. Testes moleculares para detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*

Referência Bibliográfica	Testes Utilizados	SE – ES (%)
Fegou et. Al, 2005	Cobas Amplicor	73,6- 100%
Goessen et al, 2005	Cobas Amplicor AMTD II	78- 99,9% 86,2-99,9%
Ribeiro et al, 2004	LCx	92,7-93%
Sperhackle et al, 2004	IS6110 PCR dot-blot	94-95%
Persimioni et al., 2002	AMTD II	88,– 99,2%,
Scarparo et al., 2000	AMTD II Cobas Amplicor	85,7 – 100% (P), 82,9 – 100% (ExP) 94,2 – 100% (P), 85,0 – 100% (ExP)
Della-Latta et al., 1998	AMTD II Amplicor	97,1 – 99,5% 96,7 – 100%
Eing et al., 1998	Cobas Amplicor In-House IS6110 PCR	66,3 – 99,7% 91,1 – 99,8%

SE:sensibilidade; ES: especificidade; P: amostras pulmonares, ExP: amostras extrapulmonares.
Adaptado de Drobniewski et al., (2003).

1.10.2 Métodos de Biologia Molecular *in house*

Além dos testes comerciais, alternativas de custo mais baixo (técnicas *in house*) tem sido descritas, inclusive no nosso meio, com rendimentos promissores entre as amostras com baciloscopia negativa (88% com detecção em gel de agarose e 94.4% com detecção colorimétrica), porém para serem disponibilizadas na rotina necessitam de estudos de validação inter-laboratorial e análises de custo-efetividade (Sperhacker et al., 2004). A maioria de ensaios padronizados em laboratório (*in house*) utiliza a amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR) como estratégia. Uma das regiões “alvo” mais utilizadas é a seqüência de inserção de DNA (IS6110) repetitiva e específica do complexo *M. tuberculosis*. Esta seqüência de inserção está repetida de 1 a 20 vezes no cromossomo bacteriano, conferindo uma maior sensibilidade aos testes que utilizam essa região para a amplificação (Eisenach et al., 1990; Thierry et al., 1990; Eisenach et al., 1991; Folgueira et al., 1993; Forbes and Hicks, 1993; Rossetti, 1997; Almeda et al., 2000; Portillo-Gomez et al., 2000). De maneira geral, a diferença entre os métodos *in house* reside na região de amplificação, no preparo da amostra e na detecção dos fragmentos amplificados pela PCR.

Algumas revisões qualitativas (Ieven and Goossens, 1997; ATS, 2000; Drobniowski et al., 2003) e estudos interlaboratoriais (Noordhoek et al., 1994; Noordhoek et al., 1996; Noordhoek et al., 2004) têm apontado para a grande variabilidade na sensibilidade e especificidade em diferentes estudos utilizando a PCR. As explicações para estas diferenças incluem os diferentes processos de

descontaminação das amostras, a contaminação cruzada, a inibição, o erro de amostragem, a qualidade do padrão ouro, e a análise de amostras respiratórias e não respiratórias (Sarmiento et al., 2003). Outro aspecto importante na acurácia da técnica de detecção de *M. tuberculosis* refere-se à análise do limite de detecção considerado em cada procedimento de amplificação. A tabela 2 mostra a comparação de alguns métodos de amplificação por PCR que utilizaram os *primers* IS6110 em amostras de espécimes respiratórios com a respectiva sensibilidade e especificidade, os valores de limite de detecção com valores em unidades formadoras de colônias (UFC) e a sensibilidade e especificidade em relação aos resultados das amostras clínicas obtidos em cultura (resultado em %).

Tabela 2. Técnica de detecção, limite de detecção, sensibilidade e especificidade da PCR obtidos por diferentes métodos de preparação de amostra.

Preparo Amostra	Técnica de Detecção	UFC	SE (%)	ES (%)	Referência bibliográfica
sacarose 50%	gel de agarose/Dig-PCR Elisa	<i>n.i.</i>	96,5	95,3	Borun <i>et al.</i> , 2001
lisozima/proteinase K /SDS	gel de agarose	3	59	97	Almeda <i>et al.</i> , 2000
triton/proteinase K/ tiocianato de guanidina	gel de agarose	1	94	100	Portilio-Gomes <i>et al.</i> , 2000
Tiocianato de guanidina, Sílica	Southern blotting, sonda/ biotina	100	98	100	Andersen <i>et al.</i> , 1993
fervura, SDS, chelex (Biorad)	1.gel de agarose 2. sonda /digoxigenina	30	84	87	Zambardi <i>et al.</i> , 1993
fervura	sonda/biotina	2	91	100	Nolte <i>et al.</i> , 1993
fenol/clorofórmio	colorimétrica	200	77	95	Amicosante <i>et al.</i> , 1995
fenol/clorofórmio resina	sonda /biotina	20	91	95	
partículas de zircônio clorofórmio/ isoamilico	colorimétrica <i>primers</i> /biotina	12.5	100	97	Cho <i>et al.</i> , 1995
sonicação e fervura	gel de agarose/ sonda digoxigenina	<i>n.i.</i>	91	99,8	Eing <i>et al.</i> , 1998

n.i.; não informado, UFC: unidade formadora de colônias, SE: Sensibilidade, ES: Especificidade

Para que a técnica da PCR seja executada com sucesso no diagnóstico de doenças, precauções rigorosas são essenciais e devem ser adotadas a fim de evitar resultados falso-positivos e falso-negativos. São necessárias a utilização de controles em todas as etapas do processo para confirmar a obtenção adequada do DNA da amostra clínica, a eficácia da reação de PCR e a ausência de contaminação cruzada com produto de *M. tuberculosis* nos reagentes ou no processo de manipulação (Kritski et al., 1996; Suffys et al., 2000; Valentine-Thon, 2002). Os métodos moleculares trouxeram avanços no diagnóstico das doenças nos últimos anos, entretanto a utilização destes testes exige cautela, pois, ainda são escassos, em nosso meio, estudos que avaliem a utilidade clínica destas metodologias. Alguns estudos sugerem que testes de AAN (testes comerciais, PCR *in house*) devem ser sempre solicitados junto com os testes bacteriológicos e na análise final laboratorial, os dados clínicos são imprescindíveis e devem ser considerados (Watterson and Drobniowski, 2000).

1.11 Análise de Custo Efetividade

A base desta análise de custo-efetividade é a comparação entre as atividades de rotina em uso e a intervenção proposta para a identificação de um possível impacto positivo. Para avaliação do impacto da nova tecnologia, são construídas árvores decisórias cujos ramos representam as diferentes seqüências de investigação diagnóstica que podem preceder o tratamento dos

casos de TB. A análise da seqüência de atividades até o tratamento, em cada ramo, sinaliza qual apresenta menor custo por caso ativo tratado. Para comparar o custo de cada opção de investigação, isolamos o ramo da árvore decisória e avaliamos o custo total e o que foi obtido através desse ramo.

A inclusão deste tópico atende a uma necessidade crescente no planejamento da distribuição dos recursos destinados às medidas de Saúde Pública. A associação do custo e da efetividade fornece indicação da relativa eficiência da medida a ser considerada e facilita a alocação e o gerenciamento de recursos, ao permitir que sejam identificadas intervenções com maior impacto no controle das doenças.

2.Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Determinar a utilidade das técnicas de PCR “in house” (PCR dot-blot e AG-PCR) desenvolvidas pelo CDTC/ RS para o diagnóstico da Tuberculose Pulmonar utilizando amostras respiratórias de pacientes infectados por HIV ou não atendidos em uma Unidade Hospitalar de Saúde Pública.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a acurácia e valores preditivos negativos e positivos no diagnóstico laboratorial através das técnicas de PCR *in house* para a detecção de TB pulmonar em pacientes infectados por HIV.
- Avaliar a acurácia e valores preditivos negativos e positivos no diagnóstico laboratorial através da técnica de PCR para a detecção de TB pulmonar em pacientes com baciloscopia negativa e positiva.
- Avaliar o efeito da suspeita clínica (Probabilidade Pré-teste) estimada pelos pneumologistas em pacientes com baciloscopia negativa no desempenho da técnica de PCR *in house* (PCR dot-blot) no diagnóstico de Tuberculose pulmonar.
- Avaliar o desempenho e valores preditivos negativos e positivos no diagnóstico laboratorial das técnicas de PCR *in house* através da

associação destas à técnica de baciloscopia para a detecção de TB pulmonar em pacientes infectados por HIV ou não.

- Avaliar o custo-efetividade da técnica de PCR *in house* (PCR dot-blot) em uma Unidade de Saúde Pública.

3. Material e Métodos

3.1 Pacientes

Pacientes com suspeita de Tuberculose Pulmonar, referenciados a um hospital de referência para o atendimento de TB e HIV, o hospital Sanatório Partenon do Estado do Rio Grande do Sul, foram avaliados em um estudo prospectivo de Maio de 2003 a maio de 2004. Os pacientes elegíveis foram aqueles que apresentavam sintomas clínicos de TB, como tosse por mais de 3 semanas. Todos os pacientes que participaram do estudo assinaram termo de consentimento (anexo 1) e este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética da Fundação Estadual de Pesquisa em Saúde (n. 01/2002) (anexo 4).

3.3 Logística da análise e métodos de PCR *in house* avaliados

A fim de proporcionar um melhor entendimento dos artigos que serão apresentados no item 4, seguem abaixo algumas ferramentas que visam facilitar tal compreensão.

3.3.1 Logística da avaliação

3.3.1.1 Fluxograma da logística operacional de recrutamento de pacientes e coleta de dados

A figura 1 mostra a sequência de procedimentos realizada com os pacientes do recrutamento à análise laboratorial.

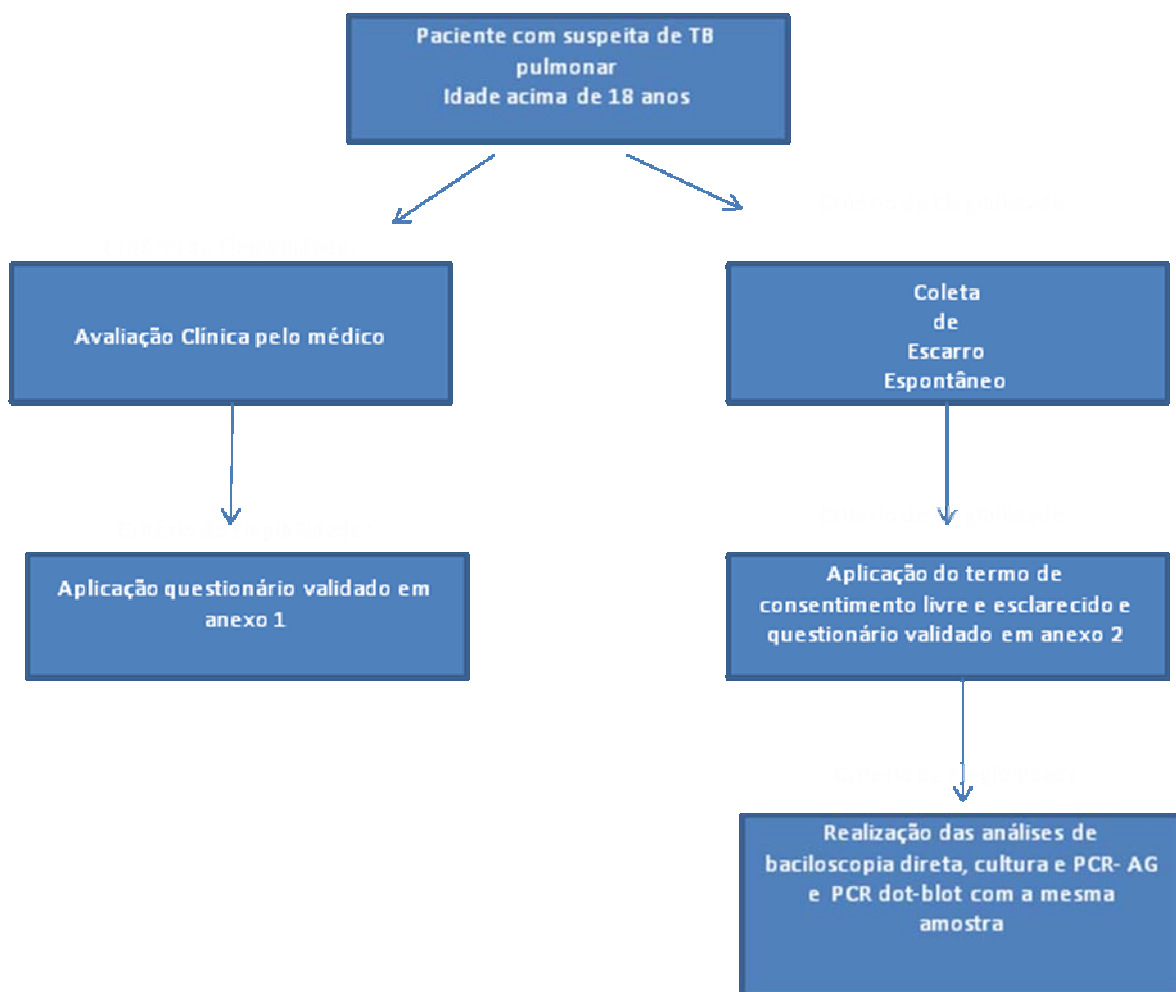


Figura 1. Fluxograma da logística operacional de recrutamento de pacientes e coleta de dados

3.3.1.2 Fluxograma das diferentes fases de análise da técnica de PCR *in house* desenvolvidas

A figura 2 mostra a sequência das diferentes análises realizadas neste estudo e apresentadas na forma de artigos.

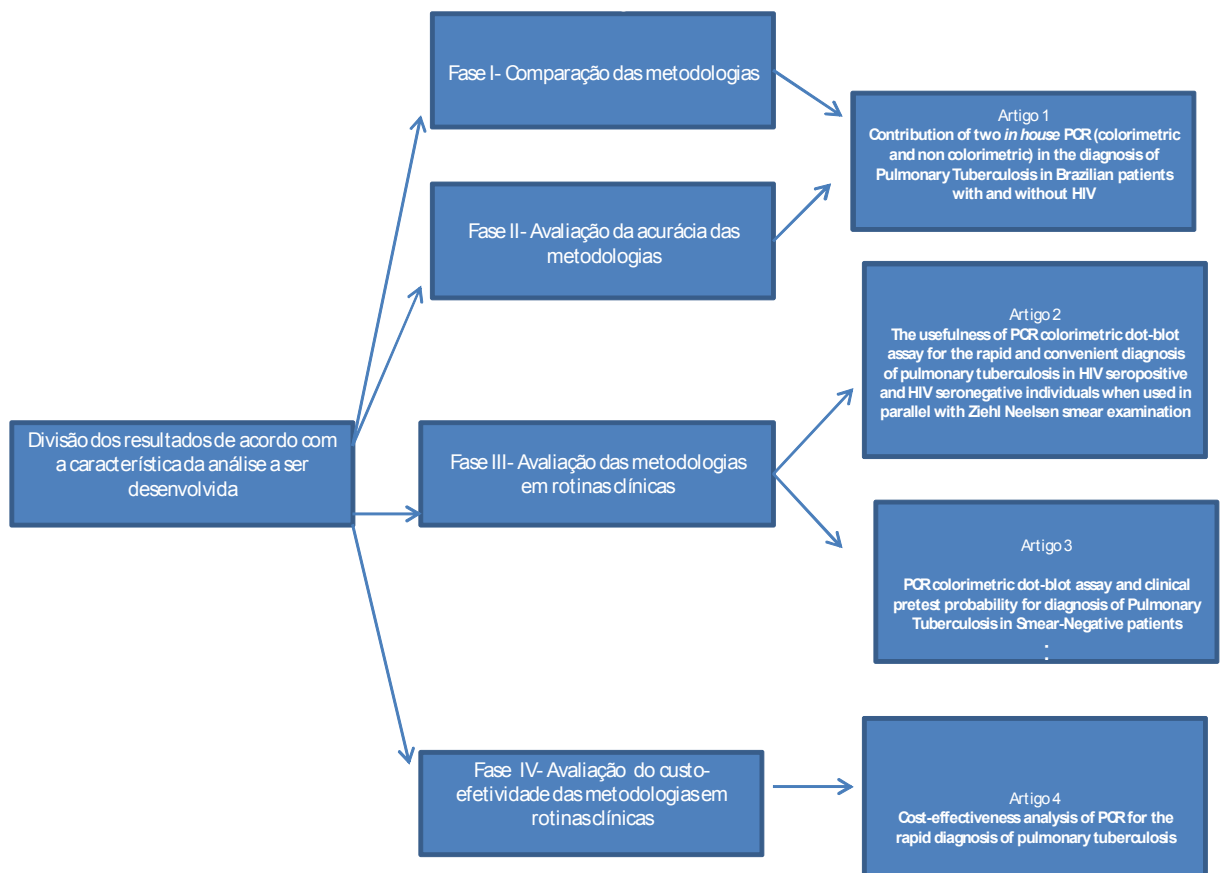


Figura 2. Fluxograma das diferentes fases de análise da técnica de PCR *in house* desenvolvidas

3.3.2 Métodos de PCR *in house* analisados

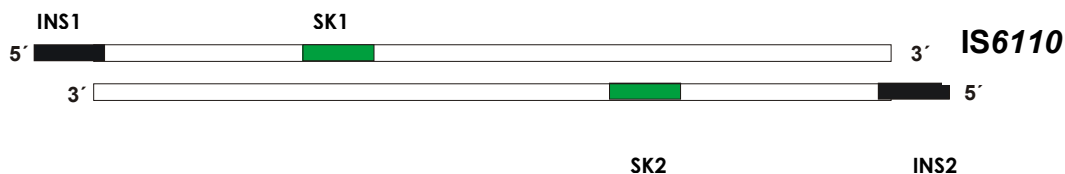
3.3.2.1 Região selecionada para amplificação por PCR

A região cromossômica utilizada como alvo de amplificações foi baseada na região do elemento IS6110 presente em múltiplas cópias no complexo *M. tuberculosis* (Eisenach, Cave et al. 1990). Foram utilizados dois pares de *primers*:

A) Os *primers* SK1 e SK2 complementares à região do elemento de inserção IS6110, os quais amplificam um fragmento de DNA de 132 pb.

B) Os *primers* biotinizados INS1 e INS2, que amplificam um fragmento de DNA de 245 pb. O produto desta amplificação foi purificado e utilizado como sonda.

A figura 3 representa a posição dos *primers* e a complementaridade destes à região do elemento de inserção IS6110.



Os primers INS1 e INS2 amplificam um fragmento de DNA correspondente a 245 pb; os primers SK1 e SK2 amplificam um fragmento de DNA de 132 pb.

Figura 3. Esquema representativo de uma região do elemento de inserção IS6110 mostrando a localização dos *primers* utilizados no estudo.

3.3.2.1 Primers utilizados para a amplificação do DNA de *Mycobacterium tuberculosis*

Os *primers* utilizados estão listados na tabela 3 e foram sintetizados pela Invitrogen (Molecular Biology Incorporating Life Technologies™ and ResGen™ Brand).

Tabela 3. Primer, seqüências, regiões, posições no genoma de *M. tuberculosis* e tamanho do fragmento de DNA amplificado referentes à sonda utilizada na hibridização e ao DNA amplificado das amostras clínicas.

Primers	Seqüências (5'⇒ 3')	Região	Posição	Tamanho do fragmento de DNA amplificado (pb)
INS-1/INS-2 Biotinilados (sonda)	CGTGAGGGCATCGAGGTGGC	IS6110	631-875	245
	CGCTAGGCGTCGGTGACAAA AACGGCTGATGACCAAATC	IS6110	666-807	132
SK1 / SK2	GGTTAGGTGCTGGTGGTCC			

A figura 4 corresponde à análise dos produtos da PCR amplificados com DNA de *M. tuberculosis*. O fragmento de DNA de 132 pb foi gerado pela amplificação com os *primers* SK1/SK2 e o fragmento de DNA de 245 pb foi gerado pela amplificação com os *primers* INS1/INS2.

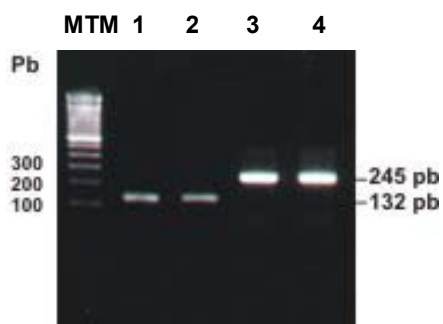


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (2%).

A primeira linha corresponde ao contém o marcador de tamanho molecular (MTM, 100bp ladder), as linhas 1 e 2 mostram os fragmentos de DNA de 132 pb, a linhas 3 e 4 mostram o fragmento de DNA de 245 pb.

3.3.2.2 PCR *in house* com detecção em gel de agarose (PCR-AG)

A reação de amplificação foi padronizada com os *primers* SK1 e SK2 utilizando o DNA de *M. tuberculosis* (H37Rv). A figura 5 corresponde à análise dos produtos de PCR amplificados. O fragmento amplificado de DNA de 132 pb foi visualizado em gel de agarose 2%.

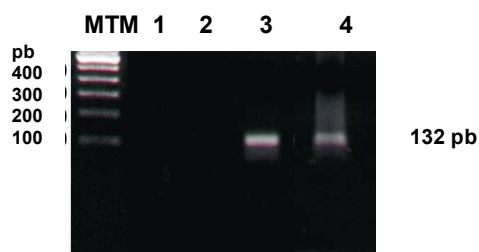


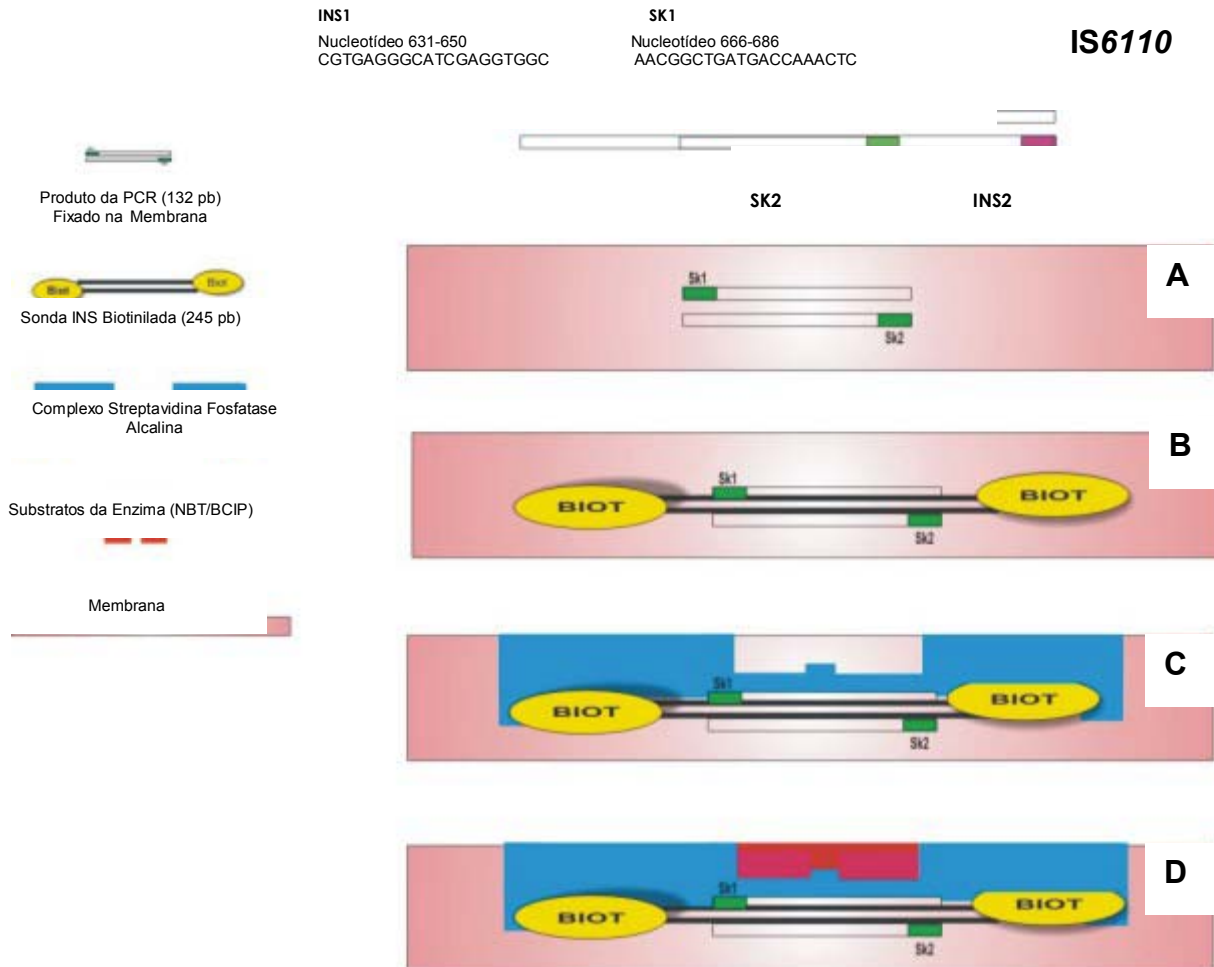
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose (2%).

A primeira linha contém o marcador de tamanho molecular (MTM, 100bp *ladder*), as linhas 1, 2 e 3 mostram o controle negativo de extração, o controle negativo de reação e o controle positivo de reação), respectivamente. A linha 4 correspondem a uma amostra clínica positiva escarro espontâneo.

3.3.2.3 PCR *in house* colorimétrico (PCR dot-blot)

Os produtos da PCR de cada amostra clínica foram transferidos para membrana de nylon (Biodyne B - Gibco-BRL) e processadas conforme protocolo padronizado.

A figura 6 é uma representação esquemática do procedimento da PCR dot-blot colorimétrico. No esquema está representado parte do elemento de inserção IS6110 e as regiões de localização de cada *primer* utilizados no procedimento.



A, B, C e D mostram as etapas do processo.

(A) O sistema envolve a imobilização (dot) na membrana dos produtos da PCR amplificados a partir das amostras clínicas.

(B) A sonda correspondendo ao fragmento de DNA de 245 pb obtido da PCR com os *primers* INS biotinilados é hibridizada com os produtos fixados na membrana.

(C) O conjugado streptavidina fosfatase alcalina é adicionado. A streptavidina se liga a biotina por afinidade.

(D) A adição dos substratos 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate (NBT) e Nitro Blue Tetrazolium (BCIP) forma um precipitado insolúvel (azul-púrpura) com a enzima, podendo então ser visualizado na membrana.

Figura 6. Representação esquemática do procedimento de Dot-blot colorimétrico.

A figura 7 representa a análise utilizando a metodologia do PCR dot-blot colorimétrico.

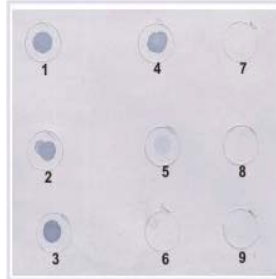


Figura 7. PCR dot-blot, realizado com os produtos da PCR obtidos de diferentes amostras de escarro espontâneo

Os pontos 1 e 2 mostram os fragmentos de DNA amplificado correspondentes a 132 pb controle positivo de reação e extração, respectivamente. Os pontos 3, 4 e 5 mostram o produto da amplificação (132 pb) correspondendo as amostras de escarro espontâneo positivas para *Mycobacterium tuberculosis*. Os pontos 6 e 7 correspondem a resultados negativos para *Mycobacterium tuberculosis*. Pontos 8 e 9 correspondem ao controle negativo de reação e extração, respectivamente.

4. Resultados

Os resultados a seguir apresentados foram organizados na forma de artigos.

A sequência de análise seguiu a sequência proposta no fluxograma apresentado na figura 2.

O artigo 1 avalia a performance da técnica de PCR *in house* utilizando dois tipos de metodologias de detecção de PCR por gel agarose e por dot-blot. A partir desta avaliação e com os resultados superiores do PCR dot-blot, partiu-se para uma avaliação da acurácia deste, quando utilizado em associação com técnicas convencionais de rotina. Então, surgiu o artigo 2 que avalia a utilidade do PCR dot-blot quando utilizado em associação com a técnica de microscopia direta por coloração de ZN.

Além disto, com a intenção de verificar a acurácia do PCR dot-blot quando associado a suspeita clínica de diagnóstico surgiu o artigo 3, sendo este já aceito para publicação.

A partir dos resultados obtidos no artigo 2, resolveu-se avaliar o custo efetividade da técnica de PCR dot-blot, quando utilizada em associação com a microscopia direta por coloração de ZN, estes dados encontram-se no artigo 4.

4.1 Artigo 1

Submissão posterior ao Brazilian Journal of Microbiology, cujas instruções para os autores estão no anexo 5 (item 9.5.1).

1 **Contribution of two *in house* PCR (colorimetric and non colorimetric) in the**
2 **diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV**

3 Luciene C. Scherer,^{1,3} ; Rosa D. Sperhacker.² ; Fernanda C. Q. Mello.⁴ ; Carla Jarczewski⁵ ;
4 Patrícia I. Cafrune.² ; Candice Michellon², Marta Osorio Ribeiro.⁶ ; Antonio Ruffino
5 Netto.⁴ ; Maria L. R. Rossetti.^{2,3} and Afrânio L. Kritski.⁴

6 1-Post Graduation Program in Biological Science- Biochemistry Department, Federal
7 University of Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre/RS/ Brazil;

8 2- Technological and Scientific Development Center -CDCT, State Foundation in
9 Production and Health Research - FEPPS/RS) Porto Alegre/RS/Brazil;

10 3- Lutheran University of Brasil-ULBRA, Canoas/ RS/ Brazil;

11 4- Tuberculosis Research Unit, Clementino Fraga Filho Hospital, UPT/ HUCFF, Federal
12 University of Rio de Janeiro -UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil;

13 5- Partenon Hospital / Secretary of Health of Rio Grande do Sul /Porto Alegre/ RS/
14 Brazil;

15 6- Public Laboratory of the State of Rio Grande do Sul (LACEN/RS), State Foundation in
16 Production and Health Research - FEPPS/RS) Porto Alegre/RS/Brazil;

17

18 *From: Technological and Scientific Development Center -CDCT, State Foundation in
19 Production and Health Research - FEPPS/RS) Porto Alegre/RS/Brazil;

20

21 Correspondence and requests for reprints should be addressed to Luciene Cardoso
22 Scherer, Technological and Scientific Development Center -CDCT, State Foundation in

23 Production and Health Research - FEPPS/RS) Porto Alegre/RS/Brazil, Av Ipiranga 5400,
24 3 andar, Centro de Desenvolvimento Científico e tecnológico- CDCT, Porto Alegre CEP
25 91000000. Phone/fax number 05133520336, Porto Alegre, Brazil. E-
26 mail:luciene.scherer@hotmail.com

27 Financial Support: this work was supported by CNPq, REDE-TB - number 62.005/01-4-
28 PADCT; ICIDR-NIH-grant number 1 U19 AI45432

29

- 29 **Key words:** *in house* PCR, HIV, tuberculosis, diagnosis
- 30 **Abbreviation List:**
- 31 AFB- Acid Fast Bacilli
- 32 CHC- Community Health Centers
- 33 HIV- Human Immunodeficiency Virus
- 34 HIV⁺-HIV seropositive
- 35 HIV⁻- HIV seronegative
- 36 MOTT -Mycobacterium Other Than Tuberculosis
- 37 MTB- *Mycobacterium tuberculosis*
- 38 NAA -Nucleic Acid Amplification
- 39 NPV- Negative Predictive Value
- 40 PCR- Polymerase Chain Reaction
- 41 PCR-AG- Polymerase Chain Reaction agarose gel electrophoresis
- 42 PCR-dot-blot- Polymerase Chain Reaction dot-blot methodology
- 43 PPV- Positive Predictive Value
- 44 PTB- Pulmonary Tuberculosis
- 45 SE- Sensitivity
- 46 SP- Specificity
- 47 PRH -Partenon Reference Hospital
- 48 TB –Tuberculosis
- 49

49 **Abstract**

50 Background: Direct smear examination with Ziehl-Neelsen (ZN) staining for the
51 diagnosis of pulmonary tuberculosis (PTB), is cheap and easy to use, but its low
52 sensitivity is a major drawback, mainly in HIV patients. So, new tools for the laboratory
53 diagnosis are urgently needed to improve the case detection rate, especially in regions
54 with high prevalence of TB and HIV.

55 Objective: To evaluate the performance of two *in house* PCR (Polymerase Chain
56 Reaction): PCR dot-blot methodology (PCR dot-blot) and PCR agarose gel
57 electrophoresis (PCR-AG) for the diagnosis of Pulmonary Tuberculosis (PTB) in HIV
58 patients.

59 Methods: A prospective study was conducted (from May 2003 to May 2004) in a
60 reference TB/HIV hospital. Sputum specimens from 277 PTB suspects were tested by
61 Acid Fast Bacilli (AFB) smear, Culture and *in house* PCR assays (PCR dot-blot and
62 PCR-AG) and the performance was evaluated. Gold standard was the culture positive
63 combined with the definition of clinical pulmonary TB.

64 Results: The overall prevalence of PTB was 46% (128/277); in HIV seropositive (HIV⁺)
65 was 54.0% (40/74). The Sensitivity and Specificity of PCR dot-blot were 74% (CI 95%;
66 66.1%-81.2%) and 85% (CI 95%; 78.8%-90.3%); of PCR-AG were 43% (CI 95%;
67 34.5%-51.6%) and 76% (CI 95%; 69.2%-82.8%), respectively. For HIV⁺ and HIV
68 seronegative (HIV⁻) Sensitivities of PCR dot-blot (72% vs 75%; p=0.46) and PCR-AG
69 (42% vs 43%; p=0.54) were similar.

70 Conclusion: This study shows that *in house* PCR may offer an improvement for ruling
71 out PTB diagnosis for PTB suspects assisted at hospitals with a high prevalence of
72 TB/HIV.

73

73

74 **Contribuição de duas técnicas de PCR in house (colorimétrica e não colorimétrica)**
75 **no diagnóstico de TB pulmonar em pacientes brasileiros infectados ou não por HIV**

76 **Resumo**

77 Introdução: Microscopia direta por coloração com Ziehl-Neelsen (ZN) para o diagnóstico
78 de Tuberculose (TB), é barata, de fácil uso, mas apresenta baixa sensibilidade
79 principalmente para pacientes HIV soropositivos, sendo necessárias novas técnicas de
80 diagnóstico para melhorar a detecção de casos de TB em regiões com alta prevalência de
81 TB/ HIV.

82 Objetivos: Avaliar o desempenho de duas metodologias de detecção de PCR *in house*:
83 PCR colorimétrico em dot-blot (PCR dot-blot) e PCR em eletroforese de gel de agarose
84 (PCR-AG) para o diagnóstico de TB Pulmonar em HIV soropositivos

85 Métodos: Um estudo prospectivo foi conduzido de maio de 2003 a maio de 2004 em um
86 hospital de referência para TB/HIV. Escarros espontâneos de 277 pacientes com suspeita
87 de TB foram testados por microscopia direta por coloração de Ziehl-Neelsen (ZN),
88 Cultura e ensaios de PCR *in house* (PCR dot-blot e PCR-AG) e o desempenho dos testes
89 foram avaliados. Padrão Ouro foi a cultura positiva combinada com a definição clínica de
90 TB.

91 Resultados: A prevalência de TB foi de 46% (128/277); em HIV soropositivo (HIV⁺) foi
92 54,0% (40/74). A sensibilidade e a especificidade do PCR dot-blot foram 74% (CI 95%;
93 66,1%-81,2%) e 85% (CI 95%; 78,8%-90,3%); do PCR-AG foram 43% (CI 95%; 34,5%-
94 51,6%) e 76% (CI 95%; 69,2%-82,8%), respectivamente. Sensibilidade do PCR dot-blot

95 (72% vs 75%; $p=0,46$) e do PCR-AG (42% vs 43%; $p=0,54$) foram similares para HIV⁺
96 and HIV soronegativos (HIV⁻).

97 Conclusão: Este estudo mostra que PCR *in house* pode oferecer um melhora na exclusão
98 de TB pulmonar em pacientes com suspeita de TB pulmonar atendidos em hospitais com
99 alta prevalência de TB/HIV.

100 **Palavras-chave:** PCR *in house*, HIV, tuberculose, diagnóstico

101

101 **Background**

102 Tuberculosis (TB) is a persistent health problem, and it is responsible for 8.5 million
103 cases per year, and when in association with human immunodeficiency virus (HIV) is one
104 of the leading infectious agents of death (27, 36). Frequently, the diagnosis of TB is
105 based on the positive Acid Fast Bacilli (AFB) smear for Ziehl-Neelsen (ZN) staining ,
106 and this method detects around 70% of cases (36). In clinical practice, the proportion of
107 positive AFB smear is around 40-60% (25). Usually, HIV patients are AFB smear
108 negative and have lower yield on AFB smear for the TB diagnosis. Moreover, these
109 patients usually, present more atypical radiological findings and higher mortality rate.
110 The usual laboratory procedure for clinical specimens involves microscopic examination
111 for the presence of AFB and isolation and identification of the organism by culture. In
112 paucibacillary infections, the current detection method is culture, which can take up to six
113 weeks to conclusion, due to the slow growth rate of mycobacteria. Timely identification
114 of mycobacterial infection in HIV patients is critical to initiate early specific treatment, to
115 improve prognosis and to reduce the risk of dissemination and spread to other
116 hospitalized patients (26). Therefore, a global strategy for the development and
117 strengthening of laboratory diagnosis is urgently needed to improve the case detection
118 rate, especially in regions with high prevalence of TB and HIV.

119 In recent years, rapid diagnostic tests based on nucleic acid amplification (NAA) tests
120 have been developed (4, 20). In industrialized nations, automated NAA commercial tests
121 are currently being used for detection of *M. tuberculosis* complex organisms in
122 respiratory specimens from adult patients, HIV seronegative and non-previously treated
123 for TB(28).

124 To evaluate the potential affordable NAA techniques in developing countries, the *in*
125 *house* methods frequently used the IS6110 element (2, 12, 22, 24, 28, 29). Accordingly,
126 we evaluated the performance of two *in house* PCR: PCR dot-Blot (colorimetric) and
127 PCR-AG (non-colorimetric), using as a target the IS6110 element, for the diagnosis of
128 Pulmonary Tuberculosis (PTB). We compared the status of HIV and of the treatment , in
129 a setting of high prevalence of TB and HIV. This study was conducted according to
130 routine procedures at the Reference Hospital of TB/HIV of a southern Brazilian city,
131 Porto Alegre.

132 **Methods**

133 **Study location and population**

134 Porto Alegre, a southern Brazilian city, when the study was developed, had a population
135 of 1,404,670, in 2004. Its public health system includes eight community health centers
136 (CHC), 30 general hospitals, 10 specialized hospitals for TB diagnosis and treatment and
137 3 hospitals based on correctional facilities. Partenon Reference Hospital (PRH) is the
138 largest TB/HIV Reference Hospital and cares for both inpatients and outpatients. In 2004,
139 1432 cases of TB were reported. Among them, 201 (20%) were TB/ HIV cases, assisted
140 at CHCs and 213 (51%) were from hospitals the public health system of Porto
141 Alegre(10).

142 **Design**

143 A prospective study was conducted to evaluate the performance of two molecular tests
144 for PTB diagnosis.

145 **Patients Eligible and Ineligible**

146 PTB suspect patients older than 18 years assisted at PRH from May 2003 to May

147 2004 were eligible. Eligible patients were those: (1) who reported more than 3 weeks of
148 cough. Patients illegible were those receiving anti-TB treatment. Patients with a history
149 of previous TB were not excluded. Patients were excluded from the study if any of the
150 following conditions were met: (1) culture was contaminated; (2) when expectorated
151 sputum was not obtained (3) laboratory or clinical data did not fulfill the SNPTB
152 definition; (4) written informed consent was not obtained from the study participant. All
153 clinical samples were sent to the Laboratory of the State of RS, State Foundation for
154 Research in Health, Porto Alegre/RS/Brazil, (FEEPS/Lacen/RS) for laboratory analysis.
155 This study was approved by the Institutional Review Boards of FEPPS/RS (n. 01/2002).

156 **Logistic**

157 PTB was diagnosed using a sputum specimen and it was collected according to WHO
158 recommendations(36). The selection of the suspects entering the diagnostic process
159 followed strictly routine diagnostic procedures of the Hospital. The local site coordinator
160 was responsible for collecting all epidemiological data (patient interview was conducted
161 with a validated questionnaire) and all specimens were sent to the Public State
162 Laboratory, for laboratory analysis. Pneumologists were blinded to PCR results for
163 the assessment of PTB cases.

164 **Clinical Methods**

165 Clinical PTB was defined by pneumologists using the clinical follow-up (symptoms, risk
166 factors and chest X-Ray). Assessment of PTB suspect was undertaken during return
167 visits by patients to the hospital and by the review of medical records respectively 6 and
168 12 months post diagnosis. Chest X-Ray was taken for those suspects whose symptoms
169 were compatible with active TB and/or whose sputum smear AFB results were negative.

170 PTB in the past was defined as a patient, during the interview, of prior use of anti-TB
171 treatment for more than 30 days.

172 PTB non-treated was defined as patients under treatment up to or less than 14 days at the
173 moment of enrolment.

174 **Laboratory methods**

175 **AFB smear, culture, and PCR methods**

176 Overall methods were performed in the same sputum.

177 **AFB smear**

178 Specimens were processed by the acetylcysteine method and were submitted to AFB
179 smear staining according to Ziehl-Neelsen (Kudoh and Kudoh 1974).

180 **Culture**

181 Specimens were tested in Löwenstein-Jensen solid medium, and those resulting positive
182 were submitted to standard identification procedures for differentiation of MTB-complex,
183 following the routine of the Public State Laboratory (16). Cultures with no growth after 8
184 weeks were scored as “negative.”

185 **PCR methods**

186 Preparation of clinical specimens was performed according to Rossetti (1997) (24). The
187 DNA was amplified by *in house* PCR (PCR dot-blot and PCR-AG) using the IS6110
188 element as target, which utilizes biotinylated primers to amplify a 132-bp DNA sequence
189 specific to the *M. tuberculosis* complex SK1 (5'-AACGGCTGATGACCAAACCTC-3')
190 and SK2 (5'-GGTTAGGTGCTGGTGGTCC-3'). The primers were synthesized by
191 Invitrogen (Molecular Biology Incorporating Life Technologies™ and ResGen™ Brand)
192 (24, 29). PCR products were analyzed in parallel using two procedures: (1)

193 electrophoresis on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized by
194 ultra-violet transilluminator and (2) transfer to a nylon membrane and hybridization
195 according to Sperhacker (2004) (29) The biotinylated probe used in hybridization was
196 obtained by amplification with primers [INS-1 (5'- *CGTGAGGGCATCGAGGTGGC* -3')
197 and INS-2 (5'-*GCGTAGGCGTCGGTGACAAA* -3'). Positive (*M.tuberculosis* Mt H37Rv)
198 and negative controls (PCR mixture with water instead of template DNA) were included
199 for each set of PCR. To detect specimen inhibitors, a duplicate tube of PCR mix for each
200 specimen was spiked with 2 µl of aqueous solution containing 10 pg of purified DNA
201 target(29).

202 **HIV**

203 Blood samples were tested for HIV1 and HIV2 by serology (GenScreen HIV Plus®
204 BioRad), according to the manufacturer's instructions, and positive tests were confirmed
205 by Western blotting (Genelabs® Diagnostics).

206 **Ethics**

207 Written informed consent was obtained from all study participants. This study
208 was approved by the Institutional Review Boards of FEEPS (n. 01/2002).

209 **Gold Standard**

210 Positive bacteriological result (at least one positive culture and biochemical
211 identification) combined with diagnosis of clinical PTB.

212 **Independent Review**

213 Two independent experts in TB diagnosis who did not participate in the study reviewed
214 clinical PTB. In the absence of consensus, a third TB expert was invited to consider if the
215 patients with discordant results would be considered to be free of TB or not.

216 **Analysis**

217 Epidemiological and laboratory data were stored in a computer database and analyzed
218 by appropriate statistical software (SPSS version 10.0). The accuracy of both PCR
219 methods were compared to the gold standard.

220

220 **Results**

221 **Study population**

222 A total of 277 PTB suspect patients were enrolled. Prevalence of PTB was 46.2%
223 (128/277) and 73.3% (203/277) were not previously treated. In HIV seropositive (HIV⁺)
224 26.7% (74/277), the prevalence of PTB was 54.0% (40/74). Some risk factors for PTB
225 were significantly more frequent in HIV⁺ patients than HIV seronegative (HIV⁻): alcohol
226 addiction (44.0% vs 25.1%; p=0.002); TB in the past (56.2% vs 23.1%, p=0.0007),
227 history of hospital admission (41.3% vs 25.6%, p=0.01), and schooling less than 8 years
228 (72.0% vs 58.6%, p=0.04) (Table 1). Weight loss was observed more frequently among
229 HIV⁺, 75.7%. The most consistent predictor of PTB in all patients was a positive culture
230 and suggestive chest radiography (R: 0.36; p<0.05) but in HIV⁺ patients it was not
231 significant (R: 0.85; p=0.32).

232 Chest X- Ray suggestive of classical tuberculosis (upper-lobe fibrocavitary) was
233 observed more frequently in HIV⁻ (67.3%) than in HIV⁺ (32.2%). (data not shown)

234 **Comparative performances of AFB smear, Culture and two *in house* PCR methods** 235 **on the routine for PTB diagnosys**

236 AFB smear sensitivity was 60% (CI 95%; 55.5%- 68.4%). PCR dot-blot sensitivity was
237 [74% (CI 95%; 66.1%-81.2%)] higher than that observed in PCR-AG sensitivity [43%
238 (CI 95%; 34.5%-51.6%)]. The negative predictive value (NPV) of PCR dot-blot (81) was
239 similar to the NPV of Culture (88); p=0.067 (Table 2)

240 Comparing results for patients with not treatment and those with previous treatment, AFB
241 smear(62%) and culture (86%) sensitivities was higher than that observed among
242 patients treated for TB in the past (47%; p=0.16), (68%; p=0.06), respectively. PCR dot

243 blot specificity (87%), among those not previously treated, was similar to the observed in
244 patients treated for TB in the past (84%; $p=0.42$) and it was higher than PCR-AG
245 specificity for TB not previously treated (71%; $p=0.36$), respectively (Table 2).

246 Among PTB suspects 71.8% (199/277) were AFB smear negative. Among those, in non
247 previously treated, PCR dot-blot had a sensitivity of 68% (CI 95%: 52.9%-81.0%) (data
248 not shown).

249 **Comparative performances of AFB smear, Culture and *two* in house PCR methods**
250 **on the routine in HIV patients for PTB diagnosys**

251 The AFB smear sensitivity was low in this group (43% to HIV⁺ and 68% to HIV⁻;
252 $p<0.05$). In HIV⁻ group, the AFB smear sensitivity was higher among not previously
253 treated patients than in those treated in the past, respectively (70% and 54%; $p<0.05$); in
254 HIV⁺ group there was not statistical difference among these groups (Table 3).

255 As shown in Table 3, culture sensitivity results remained similar (80% to HIV⁺ and 85%
256 to HIV⁻ $p=0.31$), in the two groups, as well as NPV (81) for HIV⁺ and (90) for HIV⁻.
257 PCR dot-blot sensitivity was higher than PCR-AG for HIV⁺, (72% and 42%, $p< 0.05$);
258 and HIV⁻ (75% and 43%, $p< 0.05$). NPV of PCR dot-blot was 72 to HIV⁺ and 82 to HIV⁻.
259 . NPV of PCR dot-blot was similar to that of culture in HIV⁺ group (72 and 81; $p=0.54$).

260 In HIV⁻ patients not previously treated for TB, PCR dot-blot sensitivity was higher (74%
261 vs 40%, $p> 0.05$) than that observed for those treated in the past; but it was not observed
262 in HIV⁺. (Data not shown)

263 Stratified by negative AFB smear results and comparing for HIV status, in HIV⁺, 77%
264 (57/74) were AFB smear negative; PCR dot-blot had similar sensitivities (61% to HIV⁺

265 and 64% HIV⁻, p=0.12) and specificities (85% HIV⁺ and 85% HIV⁻, p=0.10),
266 respectively. (Data not shown)

267 Inhibition and limit of detection of two *in house* PCR

268 The inhibition of two *in house* PCR was 1.9%. Twenty-three specimens presented less
269 than 50 CFU in culture (detection limit of *in house* PCR). These specimens were included
270 in the analysis. Among these cases: 7 (30%) showed chest X- Ray suggestive of classical
271 Tuberculosis, 14 (61%) weight loss, 3 (13%) hepatitis, 23 (100%) cough, 14 (61%) chest
272 pain and 15 (65%) dyspnea.

273 **Areas of ROC Curve of AFB smear, Culture, PCR dot-blot and PCR-AG of HIV**
274 **seronegative and HIV seronegative PTB suspects**

275 Among 203 HIV seronegative PTB suspects, ROC analysis showed the areas of AFB
276 smear (0.837), Culture (0.926), PCR dot-blot (0.801) and PCR-AG (0.599). Among 74
277 HIV seropositive patients the areas were (0.713), (0.900), (0.789) and (0.595),
278 respectively (Figura 1).

279

279 **Discussion**

280 In this study, among PTB suspects that were assisted at a TB/HIV Reference Hospital,
281 using the first sample of expectorated sputum, the performance of bacteriological and two
282 *in house* PCR techniques was compared. The potential of this study was to be carried out
283 in a developing country with a large number of PTB suspects analysed by HIV status and
284 previous anti-TB treatment. Patients were carefully characterized, with independent
285 review to determine the final PTB cases.

286 In this study we observed high prevalence of active PTB (46.2%), and a high rate of HIV
287 infection (27%) among PTB suspects, confirming the epidemiological data described by
288 Control Program of TB from Porto Alegre (10). The most consistent predictors of PTB in
289 all patients were culture positive and suggestive chest X- Ray, but in HIV⁺ patients this
290 was not significant, and these patients frequently present more atypical radiological
291 results(26). Moreover, we observed lower yield in the direct microscopy of expectorated
292 sputum as described previously(17, 35). These facts confirm that in developing countries
293 with high prevalence of TB and HIV, better tests and more-efficient diagnostic processes
294 are urgently needed (17).

295 Sensitivities of PCR dot-blot, showed in Table 2, ranged from 63% to 76% and presented
296 a trend to be higher than that obtained with PCR-AG (42% to 47%). The PCR dot-blot
297 sensitivities were statistically higher among not previously treated patients in comparison
298 to those treated for TB in the past, despite the HIV status. Nevertheless, similar results
299 were obtained with AFB smear and culture, suggesting that in the not previously treated
300 group there was a higher bacterial load in the clinical specimens than in the group of
301 patients treated for TB in the past.

302 Among smear negative PTB suspects with or without HIV, the sensitivity of *in house*
303 PCR (PCR dot-blot) ranged from 61% to 68%, similar to that reported in the meta-
304 analysis of Sarmiento (32% to 92%), and also from studies in developing nations using *in*
305 *house* PCR techniques (40% to 64%), and using automated NAA tests (52% to 76%) (3,
306 11, 15, 18, 23, 25, 30).

307 Specificities of *in house* PCR ranging from 76% for PCR-AG to 87% for PCR dot-blot
308 were similar to values described previously (77% to 92%) in developing countries, using
309 automated NAA tests, and lower (> 95%) than those described in industrialized countries
310 (1, 2, 6, 8, 13).

311 Lower PCR-AG specificity (71%) among those patients not previously treated could be
312 due to contact with respiratory symptomatic patients, in fact among these patients with
313 false positive results, 18 (67%) reported previous tuberculosis contact. And lower
314 specificity of PCR dot-blot (84%) among those patients with anti-TB treatment in the past
315 was due to those patients with previous infection, so it is not surprising that DNA could
316 be detected from their respiratory specimens. Decrease of specificity for PCR was similar
317 to that cited elsewhere, using *in house* PCR tests (7, 9).

318 The lower sensitivity of both *in house* PCR, PCR-AG sensitivity (42%) among those
319 patients not previously treated and PCR dot-blot sensitivity (63%) among patients with
320 anti-TB treatment in the past may be due, in part, to the presence of inhibitors that remain
321 in the specimen following the current extraction procedure and/or a small number of
322 mycobacteria unequally distributed in test suspension or below the detection limit of
323 amplification of this test (50 CFU)(29). In fact, in our study, among false negative results,
324 20 (32%) in PCR-AG and 3 (43%) patients in PCR dot-blot, were below the detection

325 limit of amplification test. The proportion of inhibitors was (1.9%) for *in house* PCR,
326 similar to studies using automated NAA (0.85% to 5%) and lower than others reports
327 using *in house* PCR (3.7% to 22.7%) (2, 13, 14, 21, 33). The use of the IS6110 insertion
328 element as the PCR target could be a potential source of decreased sensitivity, due MTB
329 lacking this element has been reported before. However, DNA fingerprinting studies
330 performed in Brazil and especially in our state (RS), did not detect the presence of these
331 strains. On the contrary, the great majority of strains presented high copy numbers of
332 IS6110 (5, 31)

333 In this report the sensitivity of AFB Smear was significantly lower among HIV
334 seropositive /TB patients, and the sensitivity of both *in house* PCR was not influenced by
335 the HIV status of the patient, it was also reported by others authors (17, 35).

336 In the present study, the analysis of plot in the ROC space of accuracy in all patients
337 shows a similar performance for culture and PCR dot-blot among HIV seropositive and
338 seronegative PTB suspects. The culture method had the best performance for PTB
339 diagnosis; however, it is necessary more than 6 weeks for its final result but fast
340 identification of micobacterial infections is necessary, mainly in HIV/TB patients, who
341 need an early appropriate and specific treatment to improve prognosis.

342 Possible study limitations were the use of only one respiratory specimen (which can lead
343 to a lower sensitivity) instead of two or three specimens as proposed by WHO to
344 outpatients. However, we analyzed outpatients and inpatients, and rapid diagnosis of PTB
345 is important for these patients and sometimes it is difficult to obtain three specimens,
346 mainly in TB/HIV patients. Other limitations were the presence of inhibitions of *in house*
347 PCR and the low limit of detection of 50 CFU. These findings may influence the

348 performance of PCR tests (25, 28). In fact, laboratory studies have pointed low
349 sensitivities of PCR for the diagnosis of PTB and the significant variability in sensitivities
350 and specificities in different studies, mainly due to the decontamination procedures, cross
351 contaminations, inhibitions sampling error, detection limit of tests and quality of the
352 reference standard (14, 19, 25).

353 This study shows that *in house* PCR may offer an improvement for rulling out PTB
354 diagnosis, for PTB suspects not treated previously, evaluated in hospitals, in the
355 environment with high prevalence of TB and HIV. Among *in house* PCR tests, PCR dot-
356 blot seems to be more appropriate for routine use, once this method includes a
357 hybridization step, which increases the sensitivity of detection. It also offers higher
358 accuracy, rapidity, ease of use, greater safety, cost effectiveness and greater objectivity in
359 the reading of results, as reported previously (32).

360 Additionally, *in house* PCR tests are costless than automated NAA and might be
361 introduced more widely after a proper evaluation in different settings of its clinical utility
362 and cost-effectiveness.

363 **Acknowledgments.** We gratefully thank Fabio Mendonça for laboratory support;
364 CEARGS (Center of studies in AIDS/ RS) for statistical support; health personnel from
365 PRH; CNPQ and REDE TB for financial support.

References

1. Al Zahrani, K., H. Al Jahdali, et al. (2001). "Yield of smear, culture and amplification tests from repeated sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis 5(9): 855-60.
2. Almeda, J., A. Garcia, et al. (2000). "Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19(11): 859-67.
3. Araj, G. F., R. S. Talhouk, et al. (2000). "Comparative performance of PCR-based assay versus microscopy and culture for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical respiratory specimens in Lebanon." Int J Tuberc Lung Dis 4(9): 877-81.
4. Brodie, D. and N. W. Schluger (2005). "The diagnosis of tuberculosis." Clin Chest Med 26(2): 247-71, vi.
5. Cafrune, P. I., L. W. Riley, et al. (2006). "Recent transmission of tuberculosis involving retired patients." J Infect.
6. Chin, D. P., D. M. Yajko, et al. (1995). "Clinical utility of a commercial test based on the polymerase chain reaction for detecting Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens." Am J Respir Crit Care Med 151(6): 1872-7.
7. Cohen, R. A., S. Muzaffar, et al. (1998). "Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum collected within 24 hours of hospital admission." Am J Respir Crit Care Med 157(1): 156-61.
8. Dalovisio, J. R., S. Montenegro-James, et al. (1996). "Comparison of the amplified Mycobacterium tuberculosis (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR,

- and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens." Clin Infect Dis 23(5): 1099-106; discussion 1107-8.
9. Dilworth, J. P., M. Goyal, et al. (1996). "Comparison of polymerase chain reaction for IS6110 and Amplicor in the diagnosis of tuberculosis." Thorax 51(3): 320-2.
 10. Equipe de Controle Epidemiológico. Coordenadoria de Vigilância em Saúde. Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre. (2005) "Análise comparativa do ingresso de casos novos de Tuberculose ocorrido na rede ambulatorial e hospitalar de Porto Alegre nos anos de 2003 e 2004." Boletim Epidemiológico 27(Ano VIII).
 11. Fegou, E., E. Jelastopulu, et al. (2005). "Sensitivity of the Cobas Amplicor system for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and extrapulmonary specimens." Clin Microbiol Infect 11(7): 593-6.
 12. Flores, L. L., M. Pai, et al. (2005). "In-house nucleic acid amplification tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression." BMC Microbiol 5: 55.
 13. Goessens, W. H., P. de Man, et al. (2005). "Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens." J Clin Microbiol 43(6): 2563-6.
 14. Ieven, M. and H. Goossens (1997). "Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory." Clin Microbiol Rev 10(2): 242-56.

15. Kambashi, B., G. Mbulo, et al. (2001). "Utility of nucleic acid amplification techniques for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in sub-Saharan Africa." Int J Tuberc Lung Dis 5(4): 364-9.
16. Kent PT and Kubica G: Public Health Mycobacteriology – a guide for level III laboratory. Centers for Disease Control and Prevention 1985
17. Kivihya-Ndugga, L., M. van Cleeff, et al. (2004). "Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus." J Clin Microbiol 42(3): 1012-5.
18. Kwiatkowska, S., J. Marczak, et al. (1999). "Clinical utility of a commercial ligase chain reaction kit for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis 3(5): 421-5.
19. Noordhoek, G. T., A. H. Kolk, et al. (1994). "Sensitivity and specificity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comparison study among seven laboratories." J Clin Microbiol 32(2): 277-84.
20. Perkins, M. D. (2000). "New diagnostic tools for tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis 4(12 Suppl 2): S182-8.
21. Piersimoni, C., C. Scarparo, et al. (2002). "Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from respiratory and extrapulmonary specimens." J Clin Microbiol 40(11): 4138-42.

22. Portillo-Gomez, L., S. L. Morris, et al. (2000). "Rapid and efficient detection of extra-pulmonary Mycobacterium tuberculosis by PCR analysis." Int J Tuberc Lung Dis 4(4): 361-70.
23. Ribeiro, F. K., V. Dettoni Vdo, et al. (2004). "Evaluation of a commercial test based on ligase chain reaction for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens." Rev Soc Bras Med Trop 37(6): 431-5.
24. Rossetti L R, J. S. B., Rodrigues V F S, Moura A R, Oliveira H, Zaha A (1997). "Improvement of Mycobacterim tuberculosis detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix." J Microbiol Meth 28: 139-146.
25. Sarmiento, O. L., K. A. Weigle, et al. (2003). "Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis." J Clin Microbiol 41(7): 3233-40.
26. Schijman, A. G., M. H. Losso, et al. (2004). "Prospective evaluation of in-house polymerase chain reaction for diagnosis of mycobacterial diseases in patients with HIV infection and lung infiltrates." Int J Tuberc Lung Dis 8(1): 106-13.
27. Sharma, S. K., A. Mohan, et al. (2005). "Miliary tuberculosis: new insights into an old disease." Lancet Infect Dis 5(7): 415-30.
28. Soini, H. and J. M. Musser (2001). "Molecular diagnosis of mycobacteria." Clin Chem 47(5): 809-14.
29. Sperhackle, R. D., F. C. Mello, et al. (2004). "Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay." Int J Tuberc Lung Dis 8(3): 312-7.

30. Su, W. J., A. P. Tsou, et al. (2000). "Clinical experience in using polymerase chain reaction for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis." Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei) 63(7): 521-6.
31. Suffys, P. N., M. E. Ivens de Araujo, et al. (2000). "Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of Mycobacterium tuberculosis and comparison with an international fingerprint database." Res Microbiol 151(5): 343-51.
32. Tansuphasiri, U., S. Suttirat, et al. (2002). "Comparison of microplate hybridization with gel electrophoresis and dot blot hybridization for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis PCR products." Southeast Asian J Trop Med Public Health 33(1): 136-46.
33. Tarhan, G., M. B. Saygan, et al. (2005). "[Retrospective evaluation of Cobas Amplicor system in the rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis complex]." Mikrobiyol Bul 39(1): 35-41.
34. TB, A. (2006). "API TB Consensus Guidelines 2006: Management of pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situations." J Assoc Physicians India 54: 219-34.
35. van Cleeff, M., L. Kivihya-Ndugga, et al. (2005). "Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya." Int J Tuberc Lung Dis 9(8): 877-83.
36. WHO (2005). "Global tuberculosis control: Surveillance, Planning, Financing." WHO report WHO/HTM/TB/2005.349

Table 1: Patient symptoms and Medical History according to HIV status

Symptoms and Medical History	HIV seronegative group			HIV seropositive group		
	Overall suspects N=203 (%)	Non previously treated TB suspects N=156 (%)	TB in the past N=47 (%)	Overall suspects N=74 (%)	Non previously treated TB suspects N=33 (%)	TB in the past N=27 (%)
Culture positive	75 (36.9)	67 (42.9)	8 (17.0)	32 (43.2)	27 (81.8)	5 (18.5)
Weight loss ^a	104 (51.2)	79 (50.6)	25(53.2)	56 (75.7)	36 (75.0)	20 (74.1)
Cough	190 (93.5)	148 (94.9)	25(53.2)	67 (90.9)	43 (89.6)	24 (88.9)
Chest pain	121 (59.6)	96 (61.5)	31 (66.0)	42 (56.7)	22 (66.7)	14 (51.9)
Dyspnea	123 (60.1)	92 (58.9)	50 (67.6)	50 (67.6)	33 (100.0)	17 (63.0)

Comparison between HIV⁺ vs HIV⁻: ^ap=0.004

Table 2. Comparative performance of AFB Smear, Culture and two *in house* PCR dot-blot methods in PTB suspects

Laboratory Results and Performance of methods	All Group ^a N=277				TB non-treated Group ^b N=203				TB in the past Group ^c N=74			
	TB N=128		Non-TB N=149		TB N=109		Non-TB N=94		TB N=19		Non-TB N=55	
Performance of AFB smear	Positive	77	1	68	0	9	1	9	0	9	1	
	Negative	51	148	41	94	10	54	10	54	10	54	
Performance of Culture	Positive	107	0	94	0	13	0	13	0	13	0	
	Negative	21	149	15	94	6	55	6	55	6	55	
Performance of PCR dot - blot	Positive	95	22	83	13	12	9	12	9	12	9	
	Negative	33	127	26	81	7	46	7	46	7	46	
Performance of PCR-AG	Positive	55	35	46	27	9	8	9	8	9	8	
	Negative	73	114	63	67	10	47	10	47	10	47	
SE	SP	99%	99	99%	100	98%	90	98%	90	98%	90	
	NPV	74	74	62%	100	47%	84	47%	84	47%	84	
SE	SP	100%	100	100%	100	68%	100	68%	100	68%	100	
	NPV	88	88	86%	90	100%	90	100%	90	100%	90	
SE	SP	85%	81	76%	86	63%	86	63%	86	63%	86	
	NPV	81	81	87%	76	84%	86	84%	86	84%	86	
SE	SP	76%	61	42%	63	47%	51	47%	51	47%	51	
	NPV	61	61	71%	63	85%	82	85%	82	85%	82	

SE: Sensitivity, SP: Specificity, PPV: Positive Predictive Value, NPV: Negative Predictive Value

^aAll group

^bTB non-treated Group

^cTB in the past Group

Table 3. Comparative performance of AFB Smear, Culture and two *in house* PCR dot-blot methods stratifying by HIV status

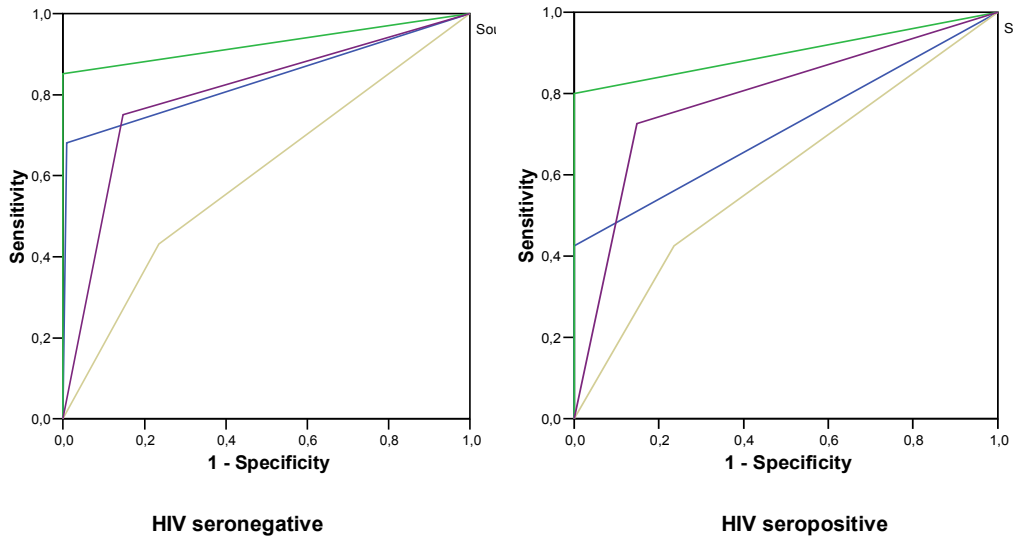
Laboratory Results and Performance of methods		HIV seronegative Group ^a N=203				HIV seropositive Group ^b N=74			
		TB N=88		Non-TB N=115		TB N=40		Non-TB N=34	
Performance of AFB smear	Positive	60	1			17	0		
	Negative	28	114			23	34		
		SE 68%	SP 99%	PPV 98	NPV 81	SE 43%	SP 100%	PPV 100	NPV 60
Performance of Culture	Positive	75	0			32	0		
	Negative	13	115			8	34		
		SE 85%	SP 100%	PPV 100	NPV 90	SE 80%	SP 100%	PPV 100	NPV 81
Performance of PCR dot - blot	Positive	66	17			29	5		
	Negative	22	98			11	29		
		SE 75%	SP 85%	PPV 79	NPV 82	SE 72%	SP 85%	PPV 85	NPV 72
Performance of PCR-AG	Positive	38	27			17	8		
	Negative	50	88			23	26		
		SE 43%	SP 76%	PPV 58	NPV 64	SE 42%	SP 76%	PPV 68	NPV 53

SE: Sensivity, SP:Specificity, PPV: Positive Predictive Value, NPV: Negative Predictive Value

^aHIV seronegative Group

^bHIV seropositive Group

Figure 1. Plot in the ROC space of accuracy estimates to each method and areas corresponds to 203 HIV seronegative and to 74 HIV seropositive (Blue: AFB Smear; Green: Culture; Yellow: PCR-AG and Purple: PCR dot-blot)



4.2 Artigo 2

Submetido na revista Journal of Clinical Laboratory Analysis, cujas instruções para os autores se encontram no anexo 5 (item 9.5.2).

A figura 8 apresenta a confirmação da submissão deste artigo à revista Journal of Clinical Laboratory Analysis.

Manuscript Central - Windows Internet Explorer

http://mc.manuscriptcentral.com/jcla#refX

Journal of Clinical Laboratory Analysis

WILEY

scholarONE
Manuscript Central

Main Menu → Authoring Dashboard

You are logged in as Luciene Scherer

Dashboard

- To submit a new manuscript, click on the link below
- To continue a submission already in progress, look for "Unsubmitted Manuscripts" below and click on the "Continue Submission" button
- To submit a revised paper click on the "Manuscripts with Decisions" queue and follow the instructions for submitting a revision

My Manuscripts		Author Resources	
0	Unsubmitted Manuscripts	Click here to submit a new manuscript	
0	Resubmitted Manuscripts in Draft	This section lists the subjects of the five most recent e-mails that have been sent to you regarding your submission(s). To view an e-mail, click on the link. To delete an e-mail from this list, click the delete link.	
0	Revised Manuscripts in Draft	JCLA-07-151 successfully submitted (10-Nov-2007) Delete	
1	Submitted Manuscripts		
0	Manuscripts with Decisions		
0	Manuscripts I Have Co-Authored		
0	Withdrawn Manuscripts		
0	Invited Manuscripts		

Submitted Manuscripts

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Created	Date Submitted	Status
JCLA-07-151	The usefulness of PCR colorimetric dot-blot assay for the rapid and convenient diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV seropositive and HIV seronegative individuals when used in parallel with Ziehl Neelsen smear examination [View Submission]	02-Nov-2007	10-Nov-2007	ADM: fischler, maryann • Under review

Manuscript Central™ v4.01 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2007. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) • [ScholarOne Privacy Policy](#)

Manuscript Central - ...

Figura 8. Comprovação da submissão do artigo

Running Title: PCR: alternative to diagnosis of Tuberculosis

The usefulness of PCR colorimetric dot-blot assay for the rapid and convenient diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV seropositive and HIV seronegative individuals when used in parallel with Ziehl Neelsen smear examination.

Luciene C. Scherer^{1,3*}; Rosa D. Spherhacke²; Maria L. R. Rossetti^{2,3}, Antonio Ruffino-Netto⁴ and Afrânio L. Kritski⁵

Affiliations: ¹Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre/RS/ Brazil, ²Centro de Desenvolvimento de Ciência e Tecnologia- CDCT, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde-FEPPS/RS Porto Alegre/RS/Brazil, ³Universidade Luterana do Brasil-ULBRA, Canoas/ RS/ Brazil, ⁴Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo ⁵Unidade de Pesquisa em Tuberculose/Programa Acadêmico de TB, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UPT/ HUCFF, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

*Correspondence to: Luciene Cardoso Scherer, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, CDCT/FEPPS, Porto Alegre/ RS/Brazil Av Ipiranga 5400, 3º andar, CEP 90610-000. Tel/fax: (+55) 51 3352 0336, Porto Alegre, Brazil. E-mail:luciene.scherer@hotmail.com

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, respiratory specimens, polymerase chain reaction, IS6110, accuracy

Financial Support¹

¹ This work was supported by CNPq, REDE-TB – Projeto Milenio I (Complemento-CNPq) processo nº 480269/2003-3; ICIDR-NIH-grant number 1 U19 AI45432

ABSTRACT

There is scarce data regarding the usefulness of molecular tests used in parallel to classic tools for Tuberculosis (TB) diagnosis under field conditions, especially in regions with high burden of co-infection TB/HIV. We evaluated the usefulness of PCR dot-blot used in parallel to Ziehl-Neelsen staining (ZN) for pulmonary Tuberculosis (PTB) diagnosis, in a TB/HIV reference hospital. Sputum from 277 patients was tested by ZN, Culture and PCR. Performances were assessed individually, in parallel, by HIV status, history of anti-TB treatment, and in different simulated TB prevalence rates.

In overall PTB prevalence was 46% (128/277); in HIV seropositive (HIV⁺): 54% (40/74); ZN had sensitivity (SE) lower in HIV⁺ than in HIV⁻ (43%vs68%;p<0.05); SE of PCR was not influenced by HIVstatus (p=0.46).

ZN in parallel with PCR showed the following results: a) among all PTB suspects: SE (90%), Specificity (84%), Likelihood (LR)⁺(5.65), and LR⁻(0.12); b) in HIV seronegative subjects: SE (92%), LR⁻(0.10); c) in non previously treated cases: SE (90%), LR⁻(0.11);d) in TB prevalence rates(5-20%): negative PV(98-99).

ZN used in parallel with PCR showed an improvement in SE, LR⁻ and negative PV. This strategy may offer a novel approach in ruling out PTB cases, especially in HIV⁻, not-previously treated, attended in hospitals in developing nations.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is one of the most important health problems in the world, with 1.8 million deaths reported each year (1). Direct smear examination with Ziehl-Neelsen (ZN) staining for the diagnosis of pulmonary tuberculosis (PTB), as employed in most low-income countries, is cheap and easy to use, but its low sensitivity is a major drawback (2). In Brazil, ZN is the recommended method both for TB diagnosis and treatment control, and sputum culture in solid medium is only indicated in PTB suspect cases, such as: a) ZN-negative results; b) paucibacillary and extrapulmonary specimens; c) therapeutic failure with suspicion of drug resistance, and d) individuals infected by HIV (3). Rapid TB diagnosis became crucial, especially in clinical specimens from subjects with atypical presentation, where direct microscopy presents low sensitivity, and culture can delay diagnosis by 3 to 6 weeks (1).

Important advances in molecular techniques, which rapidly identify mycobacterial DNA in sputa, may overcome these obstacles (2). In developing countries, *in house* polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) DNA, using the IS6110 insertion as PCR target, could be a rapid diagnostic test for tuberculosis. However, PCR methods in respiratory specimens present some caveats: a) reaction inhibitors; b) lower sensitivity in paucibacillary specimens; and c) high costs.

In most studies assessing the performance of molecular tests, PCR results are evaluated separately, in contrast to clinical practice, where diagnosis tests are usually required in association with other tests and/or clinical criteria, and, commonly culture is used as

the gold standard, and clinical criteria only to evaluate discrepant results (4).

More recently, the evaluation of the usefulness of PCR in parallel with the classic diagnostic techniques for rapid diagnosis of TB has been considered a novel approach (5-7).

In the present study, in order to compare the performance of the use of a molecular test (PCR colorimetric dot-blot assay) or culture in parallel with ZN for diagnosis of PTB, a prospective study was conducted in a TB/HIV reference hospital. This hospital is located in Porto Alegre City in the South of Brazil, where in 2004, 1432 TB cases were reported, 420 of them diagnosed in hospitals, being 51% in HIV-infected patients (8).

MATERIALS AND METHODS

In a reference center for TB and HIV, consecutive patients with suspicion of PTB attended at the Partenon Reference Hospital, Porto Alegre, Brazil were recruited. Sputum specimens were sent to the Public Reference Laboratory of State of Rio Grande do Sul for analysis. All clinical specimens were processed using the acetyl-cysteine method. ZN and culture (Lowenstein Jensen solid medium) were performed following routine procedures. Positive cultures were submitted to standard identification procedures for differentiation of the MTB complex from atypical mycobacteria(9). PCR colorimetric dot-blot assay was performed as previously published(10). Briefly, PCR products using the *IS6110* insertion element as a target for PCR, were plotted into a nylon membrane, and hybridization was performed with a specific biotinylated probe, followed by

detection with conjugated streptavidin-alkaline phosphatase. Visualization of positive reaction was obtained by adding BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate) and NBT (nitro blue tetrazolium). Positive and negative controls were included for each PCR set. In order to detect specimen inhibitors in negative results, a tube of PCR mix for each specimen was spiked with the purified DNA target (10).

The gold standard was the combination of positive culture with clinical definition of pulmonary TB (10). Clinical and final diagnosis of confirmed PTB cases were defined as those with a positive culture for MTB in the respiratory specimen; presumptive PTB, as clinical improvement after six months of anti-TB treatment, as judged by three different chest physicians not involved in this study in a blinded manner (11). Non-PTB was considered when patients were negative in acid-fast smear and MTB culture, and did not present clinical and chest radiographic changes after six months of follow-up.

Chest physicians that participate in the study were blinded as to PCR results. Patients were submitted to a standardized and validated interview, with questions including demographic variables and clinical history (e.g.: alcohol abuse, hepatitis) previously described by our group (12).

Test performances were calculated using specific formulas as a function of sensitivity (SE), specificity (SP) parallel SE of ZN and PCR: $SE_{ZN} + SE_{PCR} - (SE_{ZN} \times SE_{PCR})$; predictive values (PV) for different prevalence rates and likelihood ratio (LR), according to literature (13).

ETHICS

Written informed consent was obtained from all patients, and HIV was tested by ELISA, using Western blot as a confirmatory test. This study was approved by the Institutional Review Boards of FEEPS (n. 01/2002). LCS, RDS, MLR, ARN, ALK have no conflict of interest.

RESULTS

From May 2003 to May 2004, 277 patients with suspicions of pulmonary TB suspects were recruited at Partenon Reference Hospital, a reference center for TB and HIV, in Porto Alegre. No atypical mycobacteria was isolated from clinical samples during the study period. Overall TB prevalence was 46% (128/277), 54% (40/74) among HIV seropositive persons; 54% (109/203) in individuals not previously treated for TB, and 26% (19/74) in cases with history of anti-TB treatment.

Chest X-Ray images suggestive of classical TB (any parenchymal infiltrate or cavity located in the upper zone, defined as the area above the posterior third rib) were more frequently observed in HIV seronegative patients than in seropositive (67% vs. 32%, $p < 0.05$).

Overall, PCR dot-blot had a higher SE than ZN method (74% vs. 60%, $p < 0.05$) but lower than culture (74% vs. 84%, $p = 0.06$) (Table IA). Culture and PCR colorimetric dot-blot assay presented a positive LR of 84.0, 4.93 and negative LR of 0.16,

Kritski

0.31 respectively. ZN in parallel with PCR colorimetric dot-blot assay showed a SE of 90%, SP of 84%, positive LR of 5.65, and negative LR of 0.12. ZN in parallel with culture had a SE of 94%, SP of 99%, a positive LR of 93.6, and a negative LR of 0.06 (Table 1B).

Among PTB suspects non previously treated for TB, ZN in parallel with PCR colorimetric dot-blot assay had a SE of 90%, SP of 86%, positive LR of 6.52, and a negative LR of 0.11. And, ZN in parallel with culture approach had a SE of 94%, SP of 99%, a positive LR of 94.4 and negative LR of 0.06.

Among PTB suspects with history of anti-TB treatment, ZN in parallel with PCR colorimetric dot-blot assay had a SE of 85% and SP of 83%, positive LR of 5.06, and a negative LR of 0.18. And, ZN in parallel with culture had a SE of 87%, SP of 99%, a positive LR of 87.2 and negative LR of 0.13.

ZN sensitivity was significantly lower among HIV seropositive subjects as compared to those HIV seronegative ones (43% vs. 68%; $p < 0.05$) (Tables 2 and 3). PCR sensitivity was not influenced by HIV status ($p = 0.46$).

Among HIV seropositive subjects, PCR dot-blot had higher SE than that of ZN (72% vs. 43%; $p < 0.05$) and similar to the SE of culture (72% vs. 80%, $p = 0.54$) (Table 2A). Culture and PCR colorimetric dot-blot assay showed the following values regarding the LR results, respectively: positive LR of 80.0 and 4.80, and negative LR of 0.20 and 0.33. ZN in parallel with culture had a SE of 89%, SP of 100%, a positive LR of 88.6 and negative

Kritski

LR of 0.12. ZN in parallel with PCR colorimetric dot-blot assay had a SE of 84% and SP of 85%, a positive LR of 5.60, and negative LR of 0.19. Comparing the SE and negative LR among those individuals not previously treated and those treated for TB in the past the figures were respectively: 84% and 0.18, and 86% and 0.17 (Table 2B).

Among HIV seronegative subjects, PCR dot-blot sensitivity was similar to that observed with ZN (75% vs. 68%; $p=0.36$), and culture (75% vs. 85%, $p=0.10$) (Table 3A). Culture and PCR colorimetric dot-blot assay showed positive LR respectively of 85.0 and 5.0 and negative LR of 0.15 and 0.29. ZN in parallel with culture had a SE of 95%, SP of 99%, a positive LR of 47.8 and negative LR of 0.05. ZN in parallel with PCR colorimetric dot-blot assay had a SE of 92%, SP of 84%, positive LR of 5.80, and negative LR of 0.10. Comparing the SE and negative LR of ZN in parallel with PCR among those individuals not previously treated for TB and those that used anti-TB in the past, the figures were respectively: 93% and 0.08, and 85% and 0.18 (Table 3B).

In the present study with a TB prevalence of 46%, the negative and positive PV of PCR dot blot observed were 81% and 79%, respectively. The use of ZN in parallel with PCR dot blot among HIV seronegative individuals showed a negative and positive PV of 93% and 83%, respectively. This strategy among HIV seropositive individuals had different results, with negative and positive PV of 82% and 87%, respectively. Among HIV seropositive individuals not previously treated, the negative and positive PV of ZN with PCR was respectively 88% and 82%.

Assuming different TB prevalence scenarios, the use of ZN in parallel with PCR colorimetric dot-blot showed similar positive and negative PVs than that observed with ZN in parallel with culture, among HIV seropositive and HIV seronegative patients (Table 4). ZN associated with culture presented the best performance under all scenarios. ZN associated with PCR dot blot showed different performance. For TB prevalence of 5%-10%, usually observed in out-patient units attending individuals with cough for more than three weeks (respiratory symptomatic according to WHO), negative PV for ZN technique associated with PCR dot-blot ranged from 99-100%. In Health Units, where the TB prevalence ranges from 15% to 20%, usually General Hospitals or Ambulatory Reference Centers (TB Clinics), negative PV of this diagnostic strategy was 98-99%. In Reference TB Hospitals where the TB prevalence ranges from 30% to 50%, among HIV seronegative individuals, negative PV of ZN in parallel with PCR dot blot was 96 to 94% but among HIV seropositive ones, this value was reduced to 93 and 89% (Table 4).

DISCUSSION

The observed overall PTB prevalence of 46% and among HIV seropositive subjects of 54% confirmed the high prevalence of TB/HIV co-infection in Hospital Units in Brazil as reported by the Porto Alegre City TB Control Program and highlight the necessity to evaluate innovative approaches on TB diagnostic in these settings, where atypical chest X-Ray images and low sensitivity of ZN were more frequently observed in HIV seropositive patients, similar to that described by others (6).

Considering anti-TB treatment status, there was a tendency to have a higher sensitivity of in all tested methods in the non-treated group as compared with previous TB, and a specificity was similar to that previously reported by other authors (5).

Considering HIV status, ZN sensitivity was significantly lower in HIV seropositive subjects than in HIV seronegative ones, and PCR sensitivity was not influenced by HIV status, as reported by others (2).

The ZN used in parallel with PCR colorimetric dot-blot assay strategy showed specificities ranging from 83% to 86%, as previously described (84% to 87%) in developing countries using solely automated nucleic acid amplification tests, and lower than those described (>95%) in industrialized countries (2, 5, 14). When different prevalence rates were simulated, high negative PV was observed with TB prevalence of 5-20%, characteristic of outpatient Units and General Hospital settings. However, these figures decreased in scenarios with TB prevalence higher than 30%, especially among HIV seropositive subjects. These data confirm that the strategy of using ZN in parallel with PCR dot-blot can be used for excluding tuberculosis in outpatient units and hospital settings, particularly in HIV seronegative subjects.

The lower sensitivity of ZN used in parallel with PCR colorimetric dot-blot assay (85%) may be due to several factors. One of them is the presence of inhibitors that remained in the specimen after the extraction procedure, but in this study, the proportion of inhibitors was (1.9%) as similar to those detected in NAA tests (0.85% to 22.7%) (14, 15). Other

factors could be a small number of unequally distributed mycobacteria in the test suspension once it was splitted into three aliquots for the laboratory tests used in this study, or even levels below the detection limit for *in house* PCR (50 CFU) (10). In fact, among the false negative results, 33.3% (11/33) specimens were below the amplification test detection limit used for the colorimetric dot-blot assay. Additionally, the low copy number of IS6110 (insertion element) in MTB is reported to decrease sensitivity, but this was not previously reported in Brazil (10).

The strategy of associating results of ZN and culture showed the best performance in subjects infected or not by HIV; however, culture can delay diagnosis by 3 to 6 weeks, making the rapid diagnostic of TB difficult. Therefore, the use of ZN in parallel with PCR colorimetric dot-blot assay may provide an alternative for the rapid diagnosis of TB, particularly among HIV seropositive individuals or those with atypical presentation and/or with co-morbidities, where diagnosis it is critical for the prompt initiation of anti-TB treatment and delay may be lethal (16). Additionally, this strategy could reduce the risk of dissemination to other hospitalized patients and health care personnel.

In our study, the combination of ZN and PCR colorimetric dot-blot assay showed a great improvement in sensitivity and negative likelihood ratio. Thus, the use of ZN and PCR may offer a novel approach in ruling out pulmonary TB cases, especially among HIV seronegative subjects, not previously treated for TB, attended in hospitals in developing nations. *In house* PCR is usually less expensive than automated nucleic acid amplification tests, and should be introduced more widely in developing nations after an

Kritski

evaluation of its cost-effectiveness and refined estimates of the likelihood of TB disease in different settings.

ACKNOWLEDGMENTS

FEPPS/RS, CEARGS (Center of studies in AIDS/RS); Partenon Hospital; Brazilian REDE-TB.

REFERENCES

1. WHO: **Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing** *WHO Report 2006* 2006:362.
2. Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, Schuitema A, van Soolingen D, Nganga L, Kibuga D *et al*: **Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(3):1012-1015.
3. Tuberculose II Consenso Brasileiro -Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 30:1).
4. Flores LL, Pai M, Colford JM, Jr., Riley LW: **In-house nucleic acid amplification tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression.** *BMC Microbiol* 2005, **5**:55.
5. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC: **Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(7):3233-3240.
6. Schijman AG, Losso MH, Montoto M, Saez CB, Smayevsky J, Benetucci JA: **Prospective evaluation of in-house polymerase chain reaction for diagnosis of mycobacterial diseases in patients with HIV infection and lung infiltrates.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, **8**(1):106-113.

7. Ieven M, Goossens H: **Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory.** *Clin Microbiol Rev* 1997, **10**(2):242-256.
8. Equipe de Controle Epidemiológico/Coordenadoria de Vigilância em Saúde/Secretaria Municipal de Porto Alegre 2005. **Análise comparativa do ingresso de casos novos de Tuberculose ocorrido na rede ambulatorial e hospitalar de Porto Alegre nos anos de 2003 e 2004.** *Boletim Epidemiológico* 2005, **27**(Ano VIII).
9. Kent PT, Kubica G: **Public Health Mycobacteriology – a guide for level III laboratory.** Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 1985.
10. Sperhacke RD, Mello FC, Zaha A, Kritski A, Rossetti ML: **Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, **8**(3):312-317.
11. **ATS: Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**(4 Pt 1):1376-1395.
12. Mello FC, Bastos LG, Soares SL, Rezende VM, Conde MB, Chaisson RE, Kritski AL, Ruffino-Netto A, Werneck GL: **Predicting smear negative pulmonary tuberculosis with classification trees and logistic regression: a cross-sectional study.** *BMC Public Health* 2006, **6**:43.

13. Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL 2002: **Epidemiologia**. Editora Atheneu, São Paulo, 2002.
14. Goessens WH, de Man P, Koeleman JG, Luijendijk A, te Witt R, Endtz HP, van Belkum A: **Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens**. *J Clin Microbiol* 2005, **43**(6):2563-2566.
15. Almeda J, Garcia A, Gonzalez J, Quinto L, Ventura PJ, Vidal R, Rufi G, Martinez JA, Jimenez de Anta MT, Trilla A *et al*: **Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, **19**(11):859-867.
16. Carvalho AC, Nunes ZB, Martins M, Araujo RO, Comelli M, Marinoni A, Kritski AL: **Clinical presentation and survival of smear-positive pulmonary tuberculosis patients of a university general hospital in a developing country**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, **97**(8):1225-1230.

Table 1. Performance of ZN, Culture, and PCR dot-blot tests according to the history of anti-TB treatment.²

		All Groups ^a N=277		non-treated TB Group ^b N=203		TB in the past Group ^c N=74	
		TB N=128	Non-TB N=149	TB N=109	Non-TB N=94	TB N=19	Non-TB N=55
ZN	Positive	77	1	68	0	9	1
	Negative	51	148	41	94	10	54
	SE 60%	SP 99%	SE 62%	SP 100%	SE 47%	SP 98%	
Culture	Positive	107	0	94	0	13	0
	Negative	21	149	15	94	6	55
	SE 84%	SP 100%	SE 86%	SP 100%	SE 68%	SP 100%	
PCR dot –blot	Positive	95	22	83	13	12	9
	Negative	33	127	26	81	7	46
	SE 74%	SP 85%	SE 76%	SP 87%	SE 63%	SP 84%	

Table 1B. Performance of methods used in parallel

ZN in parallel with Culture	SE 94%	SP 99%	SE 94%	SP 99%	SE 87%	SP 99%
ZN in parallel with PCR dot –blot	SE 90%	SP 84%	SE 90%	SP 86%	SE 85%	SP 83%

² SE: Sensitivity, SP: Specificity

a: All groups b: non-treated TB Group c: TB in the past Group

Table 2. Performance of ZN, Culture, and PCR dot-blot tests according to the history of anti-TB treatment, among HIV seropositive individuals.³

		All Groups^a N=74		non-treated TB Group^b N=47		TB in the past Group^c N=27	
		TB N=40	Non-TB N=34	TB N=32	Non-TB N=15	TB N=8	Non-TB N=19
ZN	Positive	17	0	14	0	3	0
	Negative	23	34	18	15	5	19
	SE SP	43%	100%	43%	100%	37%	100%
Culture	Positive	32	0	27	0	5	0
	Negative	8	34	5	15	3	19
	SE SP	80%	100%	84%	100%	62%	100%
PCR dot -blot	Positive	29	5	23	2	6	3
	Negative	11	29	9	13	2	16
	SE SP	72%	85%	72%	87%	75%	84%

Table 2B. Performance of methods used in parallel

ZN in parallel with Culture	SE 89%	SP 100%	SE 91%	SP 100%	SE 78%	SP 100%
ZN in parallel with PCR dot -blot	SE 84%	SP 85%	SE 84%	SP 87%	SE 86%	SP 84%

3

SE: Sensitivity, SP: Specificity

a: All groups

b: non-treated TB Group

Table 3. Performance of ZN, Culture, and PCR dot-blot tests according to the history of anti-TB treatment, in HIV seronegative individuals.⁴

		All Groups ^a N=203		non-treated TB Group ^b N=156		TB in the past Group ^c N=47	
		TB N=88	Non-TB N=115	TB N=77	Non-TB N=79	TB N=11	Non-TB N=36
ZN	Positive	60	1	54	0	6	1
	Negative	28	114	23	79	5	35
	SE	68%	99%	70%	100%	54%	97%
Culture	Positive	75	0	67	0	8	0
	Negative	13	115	10	79	3	36
	SE	85%	100%	87%	100%	73%	100%
PCR dot-blot	Positive	66	17	60	11	6	6
	Negative	22	98	17	68	5	30
	SE	75%	85%	78%	86%	54%	83%

Table 3B. Performance of methods used in parallel

ZN in parallel with Culture	SE	95%	SP	99%	SE	96%	SP	99%	SE	91%	SP	99%
ZN in parallel with PCR dot-blot	SE	92%	SP	84%	SE	93%	SP	85%	SE	85%	SP	82%

c: TB in the past Group

4

SE: Sensitivity, SP: Specificity

a: All groups

b: non-treated TB Group

c: TB in the past Group

Table 4. Simulation of positive and negative predictive values of ZN and Culture/ PCR dot-blot tests according to different TB prevalence rates.⁵

Simulated Prevalence <i>Rates</i>		Subjects with HIV ^a N=74		Subjects without HIV ^b N=203	
		TB N=40 PPV	TB N=34 NPV	TB N=88 PPV	TB N=115 NPV
5%	ZN / Culture	100	99	83	100
	ZN / PCR dot -blot	23	99	23	100
10%	ZN / Culture	100	99	91	99
	ZN / PCR dot -blot	38	98	39	99
20%	ZN / Culture	100	97	96	99
	ZN / PCR dot -blot	58	98	59	98
30%	ZN / Culture	100	95	98	98
	ZN / PCR dot -blot	71	93	71	96
40%	ZN / Culture	100	93	98	97
	ZN / PCR dot -blot	79	89	79	94
46% ^c	ZN / Culture	99	88	98	96
	ZN / PCR dot -blot	87	82	83	93

5

PPV: Positive Predictive Value NPV: Negative Predictive Value

a: Subjects with HIV

b: Subjects without HIV

c: The present study

4.3 Artigo 3

Aceito na revista BMC Public Health e se encontra em fase final de edição. A figura 9 apresenta o resumo do artigo 3 na PUBMED.

PCR colorimetric dot-blot assay and clinical pretest probability for diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Smear-Negative patients.

Scheer LC, Sperhake RD, Jarczewski C, Cafrune PI, Minghelli S, Ribeiro MO, Mello FC, Ruffino-Netto A, Rossetti ML, Kritski AL.

ABSTRACT: BACKGROUND: Smear-negative pulmonary tuberculosis (SNPTB) accounts for 30% of Pulmonary Tuberculosis (PTB) cases reported annually in developing nations. Polymerase chain reaction (PCR) may provide an alternative for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB); however little data are available regarding the clinical utility of PCR in SNPTB, in a setting with a high burden of TB/HIV co-infection. METHODS: To evaluate the performance of the PCR dot-blot in parallel with pretest probability (Clinical Suspicion) in patients suspected of having SNPTB, a prospective study of 213 individuals with clinical and radiological suspicion of SNPTB was carried out from May 2003 to May 2004, in a TB/HIV reference hospital. Respiratory specialists estimated the pretest probability of active disease into high, intermediate, low categories. Expecterated sputum was examined by direct microscopy (Ziehl-Neelsen staining), culture (Lovenstein Jensen) and PCR dot-blot. Gold standard was based on culture positivity combined with the clinical definition of PTB. RESULTS: In smear-negative and HIV subjects, active PTB was diagnosed in 28.4% (43/151) and 42.2% (19/45), respectively. In the high, intermediate and low pretest probability categories active PTB was diagnosed in 67.4% (31/46), 24% (6/25), 7.5% (6/80), respectively. PCR had sensitivity of 65% (CI 95%: 50%-78%) and specificity of 83% (CI 95%: 75%-89%). There was no difference in the sensitivity of PCR in relation to HIV status. PCR sensitivity and specificity among non-previously TB treated and those treated in the past were, respectively: 69%, 43%, 85% and 80%. The high pretest probability, when used as a diagnostic test, had sensitivity of 72% (CI 95%: 57%-84%) and specificity of 80% (CI 95%: 78%-92%). Using the PCR dot-blot in parallel with high pretest probability as a diagnostic test, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were: 90%, 71%, 75%, and 88%, respectively. Among non-previously TB treated and HIV subjects, this approach had sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 91%, 79%, 81%, 90%, and 90%, 65%, 72%, 88%, respectively. CONCLUSION: PCR dot-blot associated with a high clinical suspicion may provide an important contribution to the diagnosis of SNPTB mainly in patients that have not been previously treated attended at a TB/HIV reference hospital.

PMID: 18096069 [PubMed - as supplied by publisher]

Figura 9. Comprovação do resumo na PUBMED

PCR colorimetric dot-blot assay and clinical pretest probability for diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Smear-Negative patients

Luciene Cardoso Scherer^{1,3§*}, Rosa Dea Sperhackle², Carla Jarczewski⁵, Patrícia I. Cafrune², Simone Minghelli⁶, Marta Osório Ribeiro⁶, Fernanda C. Q. Mello⁴, Antonio Ruffino-Netto⁷, Maria L. R. Rossetti^{2,3} and Afrânio L. Kritski^{4*}

¹Programa de pós Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre/RS/ Brazil

²Centro de Desenvolvimento de Ciência e Tecnologia- CDCT, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde-FEPPS/RS, Porto Alegre/RS/Brazil

³Universidade Luterana do Brasil-ULBRA, Canoas/ RS/ Brazil

⁴Unidade de Pesquisa em Tuberculose, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UPT/ HUCFF, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro,RJ, Brazil

⁵Hospital Sanatório Partenon /Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul/Porto Alegre/RS/ Brazil

⁶State Reference Laboratory (Laboratório Central do Rio Grande do Sul- Lacen/RS), Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde-FEPPS/RS) Porto Alegre/RS/Brazil

⁷Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Email addresses:

LCS: luciene.scherer@hotmail.com

RDS: deasperhacke@hotmail.com

CJ: jarczews@terra.com.br

PIC: patricia_cafrune@hotmail.com

SM: sminghelli@terra.com.br

MOR: martaoso@terra.com.br

FCQM: fcqmello@hucff.ufrj.br

ARN: aruffino@fmrp.usp.br

MLRR: mrossett@terra.com.br

ALK: kritskia@gmail.com

Abstract

Background

Smear-negative pulmonary tuberculosis (SNPTB) accounts for 30% of Pulmonary Tuberculosis (PTB) cases reported annually in developing nations. Polymerase chain reaction (PCR) may provide an alternative for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB); however little data are available regarding the clinical utility of PCR in SNPTB, in a setting with a high burden of TB/HIV co-infection.

Methods

To evaluate the performance of the PCR dot-blot in parallel with pretest probability (Clinical Suspicion) in patients suspected of having SNPTB, a prospective study of 213 individuals with clinical and radiological suspicion of SNPTB was carried out from May 2003 to May 2004, in a TB/HIV reference hospital. Respiratory specialists estimated the pretest probability of active disease into high, intermediate, low categories. Expecterated sputum was examined by direct microscopy (Ziehl-Neelsen staining), culture (Lowenstein Jensen) and PCR dot-blot. Gold standard was based on culture positivity combined with the clinical definition of PTB.

Results

In smear-negative and HIV subjects, active PTB was diagnosed in 28.4% (43/151) and 42.2% (19/45), respectively. In the high, intermediate and low pretest probability categories active PTB was diagnosed in 67.4% (31/46), 24% (6/25), 7.5% (6/80), respectively. PCR had sensitivity of 65% (CI 95%: 50%-78%) and specificity of 83% (CI 95%: 75%-89%). There was no difference in the sensitivity of PCR in relation to HIV status. PCR sensitivity and specificity among non-previously TB treated and those

treated in the past were, respectively: 69%, 43%, 85% and 80%. The high pretest probability, when used as a diagnostic test, had sensitivity of 72% (CI 95%:57%-84%) and specificity of 86% (CI 95%:78%-92%). Using the PCR dot-blot in parallel with high pretest probability as a diagnostic test, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were: 90%, 71%, 75%, and 88%, respectively. Among non-previously TB treated and HIV subjects, this approach had sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 91%, 79%, 81%, 90%, and 90%, 65%, 72%, 88%, respectively.

Conclusion

PCR dot-blot associated with a high clinical suspicion may provide an important contribution to the diagnosis of SNPTB mainly in patients that have not been previously treated attended at a TB/HIV reference hospital.

Background

Tuberculosis (TB) is one of the most widespread mortality-causing infectious diseases in humans. Timely detection of the disease allows the institution of an effective and life-saving treatment, thereby reducing transmission to close contacts. Conventional diagnosis of Pulmonary Tuberculosis (PTB) is time-consuming, and the acid fast bacilli (AFB) smear has a low sensitivity (40%-60%) [1]. HIV infection has been associated with an increased incidence of smear negative pulmonary tuberculosis (SNPTB) and a higher mortality rate in TB patients. [2-4]. In Brazil, almost 30% of PTB cases among adults are SNPTB [2-4]. Diagnosis of SNPTB is a difficult task and, in developing countries, the majority of these cases have been treated only on the basis of clinical and chest radiographic findings. Without a standardized clinical work up, the misdiagnosis rates have been estimated to be as high as 35% [5]. Therefore, in settings with a high rate of TB and HIV, the clinical evaluation of new tools for smear negative PTB diagnoses is extremely valuable [1, 6]

In industrialized countries, tests for *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), using rapid nucleic acid amplification (NAA), have been considered a major breakthrough in the diagnosis of PTB [7]. In developing countries, the *in house* polymerase chain reaction (PCR) for amplification of MTB DNA, using the IS6110 insertion element as a target, offers a potentially sensitive, specific and low-cost test that could provide a rapid diagnosis of PTB [8-11].

In these settings, the published evaluations of NAA techniques for smear negative PTB diagnosis have been based mainly on laboratory criteria for diagnosis of disease with or without clinical records used to evaluate discrepant results [11-17].

In the present study, we investigated the performance of a home-made colorimetric PCR (PCR dot-blot) to diagnose TB using expectorated sputum from patients suspected of having SNPTB, in isolation and in parallel with pretest probability (based on Clinical Suspicion) in a hospital setting with a high burden of TB and HIV. The PCR technique performance was compared with conventional routine diagnostic methods for smear negative patients.

Methods

Setting and patient selection

Consecutive adults suspected of having SNPTB, referred to the TB and HIV Reference Center, Parthenon Reference Hospital (PRH) in Porto Alegre City, capital of Rio Grande do Sul, State of Brazil, were studied prospectively, from May 2003 to May 2004. SNPTB suspects were referred from community health care units to have their respiratory specimens cultured for mycobacteria, according to Brazilian National Guidelines [18].

Eligible patients were those: (1) who reported more than 3 weeks of cough; (2) who had two consecutive samples of spontaneous sputum that were acid fast bacilli smear-negative. Patients illegible were those receiving anti-TB treatment. Patients with a history of previous TB were not excluded. Patients were excluded from the study if any of the following conditions were met: (1) culture was contaminated; (2) when expectorated sputum was not obtained (3) laboratory or clinical data did not fulfill the SNPTB definition; (4) written informed consent was not obtained from the study participant. All clinical samples were sent to the Laboratory of the State of RS, State Foundation for Research in Health, Porto Alegre/RS/Brazil, (FEEPS/Lacen/RS) for

laboratory analysis. This study was approved by the Institutional Review Boards of FEPPS/RS (n. 01/2002).

Suspects of SNPTB, after signing their written informed consent, underwent a validated questionnaire with questions regarding demographic variables and clinical history (e.g.: smoking, alcohol abuse, HIV infection/AIDS)[19]. Chest radiographs and physical examination was performed by a respiratory specialist using a standardized form. Respiratory specialists were blinded for the results of cultures and PCR dot-blot, and laboratory technicians were blinded for the chest radiographs results and clinical predictors. HIV testing by ELISA was performed, using Western blot as a confirmatory test.

Estimate of pretest probability

To estimate pretest probability (clinical suspicion), all eligible individuals were classified into three relative risk categories during the first appointment: low ($\leq 25\%$); intermediate (26%-75%); and high ($>75\%$) pretest probabilities of active PTB. Classifications were made by four respiratory specialists (2 with 10 years of experience and 2 with 20 years of experience in diagnosing TB). This was an estimate of disease probability based on clinical history, physical examination, other laboratory data available besides microbiological tests, and chest radiographs evaluation performed using a validated form [19].

Radiographic analysis

Chest radiographs were classified as typical, compatible, atypical and normal. Typical were those considered as having any parenchymal infiltrate or cavity localized in the upper zone (defined as the area above the posterior third rib); compatible were those

presenting a miliary pattern, pleural effusion or thoracic adenopathy, and atypical those showing any other abnormality [19].

Case definition

PTB cases were defined as those with a positive culture for MTB in the respiratory specimen or those with clinical and radiological improvement after six months of solely anti-TB treatment, as judged by three different chest physicians in a blinded review, not involved in this study [20]. Non-PTB was considered in patients whose acid-fast smear and culture for MTB were negative and who had no chest radiographic changes after six months of follow-up. PCR results were not available for routine care or for the panel of experts.

Gold standard criteria for SNPTB final diagnosis included all PTB cases, confirmed or not by culture.

Routine laboratory process

All sputum specimens were processed at the Public Reference Laboratory. All sputum specimens were tested by the Ziehl- Neelsen method, cultured in Lowentein Jensen and identified according to Kubica's method [21].

The presence of the amplified fragment derived from *IS6110* insertion element sequence in PCRs positives was checked by electrophoresis with 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light [16]. The positive and negative controls were included in electrophoresis analysis.

The PCR colorimetric dot-blot assay was performed as previously published [16]. Briefly, the biotinylated PCR products were transferred to a nylon membrane and hybridization was performed with a specific probe. The detection of hybridization was

performed using a conjugated streptavidin-alkaline phosphatase probe. The positive reaction was obtained by adding BCIP and NBT (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate and nitro blue tetrazolium). The positive and negative controls were included for each set of PCR. To detect specimen inhibitors in negative results, a tube of PCR mix for each specimen was spiked with purified DNA target. All PCR tests with discrepancies in results were tested in duplicate.

Data analysis

Epidemiological and laboratory data were entered into a computer database and analyzed by appropriate statistical software (SPSS version 10.0). The endpoints were sensitivity (SE), specificity (SP), positive predictive and negative predictive values (PPV, NPV) for detection in smear-negative subjects. For MTB DNA detection, the analyses of PCR SE, SP, PPV, NPV were performed on a per-study-subject basis, using the diagnosis of PTB as a reference standard (defined above). Agreement between the PCR duplicates was evaluated using the Kappa score, a measurement of agreement that considers the excess of the amount of agreement that could be expected by chance.

For secondary analysis, using the high pretest probability (HPP) as a diagnostic test, suspects of SNPTB with high pretest probabilities were considered as positive for active PTB, and those with intermediate and low pretest probabilities were considered negative.

Additionally, test performances of HPP in parallel with PCR as a diagnostic test were calculated using specific formulas: SE of HPP with PCR: $SE_{HPP} + SE_{PCR} - (SE_{HPP} \times SE_{PCR})$, predictive values (PV) for different prevalence rates according to the literature[22].

Results

Of the total of 277 SNPTB suspects enrolled, 64 (23.1%) were not included in the analysis for the following reasons: 63 (22.6%) had an incomplete set of clinical data (14 patients had no chest X-ray available; 48 did not fulfill the SNPTB definition, one refused to participate, and the culture of one was contaminated. Of the 213 SNPTB suspects included in the analysis, all with known HIV test results, 104 (48.8%) were diagnosed with active TB. Stratifying by HIV status, the sensitivity of acid-fast bacilli in expectorated sputum was lower in HIV seropositive than in HIV seronegative suspects of SNPTB (67% vs 41%; $p=0.01$). Among the 213 SNPTB suspects, 62 (29%) had positive smear acid-fast bacilli tests and were excluded. In this study, data were analyzed for 151 SNPTB suspects with negative smear tests. Overall, active PTB was diagnosed in 28.4% (43/151) of patients, HIV infection in 29.8% (45/151), and a history of previous PTB was referred to by 35.0% (53/151). Positive culture results occurred in 69.8% (30/43) of all TB cases, and 73.7% (14/19) of HIV seropositive TB cases.

Analysis of pretest probability (clinical suspicion) for PTB

Clinical features of SNPTB suspects are shown in Table 1. In 151 SNPTB suspects, according to risk categories, the prevalence of PTB in high, intermediate and low clinical pretest probabilities was 67.4% (31/46), 24% (6/25) and 7.5% (6/80), respectively ($p<0.05$). The proportion of patients with a suggestive chest radiograph increased steadily in those with a clinical suspicion of TB groups; 0% of low probability patients had suggestive radiographs, 24% in the intermediate group, and 78% of the high level group ($p<0.001$).

Comparative performance analysis of tests

The performance of tests for detection of MTB and diagnosis of PTB are shown in Table 2. The PCR sensitivity was 65% (CI 95%, 50%-78%) and specificity was 83% (CI 95%, 75%-89%).

When the pretest probability (Clinical Suspicion) is used as a diagnostic test, the high pretest probability sensitivity was 72% and specificity was 86%. The Intermediary pretest probability sensitivity was 14% and specificity was 82%. The Low pretest probability sensitivity was 14% and specificity was 31%.

PCR had a similar sensitivity to the culture results (65% vs 70%, $p=0.65$) and to the high pretest probability (65% vs 72%; $p=0.66$). The PCR dot-blot demonstrated 18 false-positive results (9 had TB in the past, 1 presented a scar image in the chest X-ray that resembled inactive TB, 4 were HIV+, 4 referred proximity with smear positive PTB cases in the last 6 months). The PCR dot-blot demonstrated 15 false-negative results. The value of the Kappa score obtained between the duplicates of PCRs was 100%. PCR dot-blot inhibition was found in one SNPTB suspect (2.3%).

In a parallel evaluation, the sensitivity of PCR used in parallel with the high pretest probability was higher than the sensitivity of the high pretest probability when used alone (90% vs 72%), and of culture sensitivity (90% vs 70%) (Table 2B). PCR colorimetric dot-blot assay, used in parallel with the high pretest probability, had a PPV and NPV of 75% and 88%, respectively. The NPV was similar to that observed with culture alone (88% vs 89%). Comparing the SE and NPV of PCR used in parallel with the high pretest probability among those individuals not previously treated and those treated for TB in the past, the figures were respectively 91%, 90% vs 83%, 79%, $p>0.05$.

In HIV seropositive subjects, the sensitivity of PCR was 63% (CI 95%, 40%-82%), and specificity was 85% (CI 95%, 66%-94%). The PCR sensitivity was similar to that of culture (74%) and to the high pretest probability method (74%). The PCR colorimetric dot-blot assay, used in parallel with the high pretest probability, had a SE, SP, PPV and NPV of 90%, 65%, 72%, and 88%, respectively.

In HIV seronegative subjects the sensitivity of PCR was 66%, and specificity was 83%. PCR sensitivity was similar to that of culture (67%) and to the high Pretest Probability method (71%). The PCR colorimetric dot-blot assay used in parallel with the high pretest probability had a SE, SP, PPV and NPV of 90%, 74%, 77%, and 89%, respectively.

Considering the HIV status and comparing the SE and NPV of PCR with high pretest probability among those individuals not previously treated and those treated for TB in the past, the figures were respectively: 91%, 90%, and 89%, 88% for HIV seropositive subjects and 93%, 92% and 83%, 80% for HIV seronegative group.

An increased sensitivity of PCR, when used in parallel with the high pretest probability, was observed in non-previously treated patients, compared to those who had had previous anti-TB treatment (sensitivity: 91% vs 83%). Similar results were found in HIV seropositive study subjects, in which the sensitivity was 91% among non-previously treated cases and 89% among those treated in the past. In HIV seronegative suspects, similar results were observed, in which sensitivity was 93% among non-previously treated cases and 83% among those treated in the past.

An increased specificity of PCR associated with a high pretest probability was observed in non-previously treated patients, compared to those who had previous anti-TB

treatment (specificity: 79% vs 61%). Similar results were found in HIV seropositive study subjects: specificity was 79% among non-previously treated cases and 75% among those treated in the past. In HIV seronegative subjects, using the same diagnostic test, the specificity was 80% among non-previously treated cases and 62% among those treated in the past.

Assuming different TB prevalence scenarios, the use of the PCR colorimetric dot-blot in parallel with a high clinical suspicion of SNPTB showed similar positive and negative PVs, among HIV seropositive and HIV seronegative patients (Figure 1). In regions from developing nations with a estimated TB prevalence of 5%-10%, described in out-patient units attending persons with coughs for more than three weeks (respiratory symptomatic, according to WHO), NPV for the PCR colorimetric dot-blot technique used in parallel with a high clinical suspicion of SNPTB, ranged from 98 to 99%, among HIV seropositive and HIV seronegative subjects. In Health Units, in which the prevalence ranges from 15% to 20%, usually in General Hospitals or Ambulatory Reference Centers (TB Clinics), negative PV of this diagnostic strategy ranged from 96% to 97%. In Reference TB Hospitals where the TB prevalence ranges from 30% to 40%, among HIV seronegative individuals, NPV of PCR colorimetric dot-blot, used in parallel with a high clinical suspicion of SNPTB, ranged from 95% to 92%, and among HIV seropositive individuals, this figure was of 94% and 91%, respectively (Figure 1).

The median time to reveal growth of MTB was 30 days (interquartile range [IQR] 30 to 45) for culture and the median time for detection of MTB by PCR was 3.32 days (IQR 3.0 to 3.75), respectively ($p < 0.01$). Within one week, of the 30 positive cultures, none were positive, whilst PCR detected 93% of positive specimens ($p < 0.01$).

Discussion

We evaluated the performance of tests in SNPTB suspects. The strengths of this study, carried out in a developing country, included: a) a large number of SNPTB suspects, b) comparison were made according to HIV status, history of previous anti-TB treatment, the different levels of clinical suspicion and pretest probability and, c) the prospective design, ensuring a more complete clinical, laboratory, and radiographic information. Individuals were carefully characterized by independent reviews to determine the final diagnosis.

In this study, performed at the Hospital Reference Center, we observed a high prevalence of active PTB (48.8%) and TB /HIV co-infection (29.8%), confirming the epidemiological data described by the TB Control Program of Porto Alegre City, where 29% of all new TB cases reported yearly are diagnosed in hospitals and where there is a high TB and HIV burden[23].

The prevalence of PTB for the high pretest probability group was 67.4%, lower than that described in the literature where smear-positive and smear-negative PTB were included in analyses, the prevalence of PTB for intermediate pretest probabilities was 24%, similar to that (29%) described by Catanzaro, but higher than that described by Lim (3.4%). PTB prevalence for low pretest probability was 7.5%, higher than that cited elsewhere with low burdens of TB and HIV infection in health settings [24-26].

The moderate PCR sensitivity and specificity in SNPTB suspects (sensitivity: 65%; specificity: 83%) observed were similar to the sensitivities (61%-83%) and specificities (84%-92%) described by others [11, 13, 14]; however the specificities obtained were lower than those described in industrialized countries (>95%) [27]. As

mentioned by others, in this report, the sensitivity of PCR was not influenced by the HIV status of the patient [12, 28].

Decreased sensitivities of new diagnostic tests are expected among smear-negative pulmonary TB cases. In this study, this may be due to: 1) the presence of inhibitors that remain in the specimen after the extraction procedure; 2) a small number of mycobacteria unequally distributed in the test suspension; 3) a mycobacterium level that is below the detection limit of *in house* PCR (50 CFU) [16]. The proportion of inhibitors was 2.3%, and this result was lower than that reported by other studies using home-made PCR (22.7%) and similar to those using automated NAA (0.85%-5.0%) [17, 27, 29]. Twenty-three specimens presented less than 50 CFU in culture, which is below the detection limit of the test. Partial loss of mycobacterial homogeneity, leading to unequal distribution in the test suspension, may be due to the division of the suspension into three aliquots for use in laboratory tests. Additionally, a potential source of decreased sensitivity may be the use of the IS6110 insertion element as the target for PCR, since MTB can present low copy numbers of the element. Meanwhile, DNA fingerprinting studies, performed in Brazil, did not find the presence of these strains, as mentioned by Sperhacke et al [16].

The decrease in specificity was due to eighteen false-positive results from patients that referred to previous anti-TB treatment, thus it is not surprising that DNA could be detected in their respiratory specimens, however the period elapsed between the end of previous anti-TB treatment in these patients and the reported positive PCR analyses was not collected, and this is a limitation of this study.

Using a high pretest probability as a diagnostic test for SNPTB diagnosis, this test had a sensitivity of 72% and a specificity of 86%; these values were similar to those observed with culture and PCR. These low accuracies can be explained by the fact that the evaluation of patients was performed by young or less experienced physicians, as described by LIM et al [30]. The large disparity in sensitivities found when the clinical suspicion (pretest probability) is used as a diagnostic test, can be explained due to: a) the classification in risk categories based on based on clinical data, b) different years of experience in the SNPTB diagnosis of physicians that evaluated the patients. Therefore, when a high, intermediate and low probability pretest is used as a diagnostic test, patients with high risk had sensitivities higher than those of patients with intermediate and low risk, because these patients had more symptoms compatible with SNPTB.

The clinical evaluation used in parallel with the PCR test may be an alternative to the use of the PCR test for rapid diagnosis of PTB, especially in a hospital setting with a high burden of TB/HIV co-infection. The combination of clinical judgment and amplification results strongly enhances a rapid and correct diagnosis of PTB [26].

In this study, when we used PCR in parallel with high pretest probability, the diagnostic appeared to offer a higher negative predictive value in SNPTB subjects that had not been previously treated and in HIV seronegative cases, as described by others [24, 25, 30]. In non-previously treated and HIV seronegative cases, the performance results (SE: 93%; NPV: 92%) were similar to those recently described by Piersimoni et al, using automated tests in 214 PTB suspects [26].

Due to the small number of active TB in the group with the low pretest probability, additional evaluation is warranted in order to analyze the appropriateness of

the parallel use of the PCR technique in this group of patients. However, the most difficult group for clinical assessment is the intermediate risk group, where PCR, used in parallel with the intermediary pretest (Clinical Suspicion), appears not to be useful, as already suggested by others. The prevalence of PTB may be overestimated in the intermediate risk group, thus the utility of PCR assay in these patients needs further evaluation, using more accurate clinical selection criteria [25, 30].

The PCR dot-blot was selected due to its low cost (around U\$12), simple extraction method and the colorimetric end point, all factors that might be expected to facilitate the transfer of NAA tests to laboratories in low income countries [28, 31]. Additionally, as clinical risk assessment is more likely to reflect physician decision-making, to our knowledge, this is the first prospective study that relates pretest probability with the performance of a PCR in consecutive patients suspected of having SNPTB, in South America.

In our study, we pursued, in a large number of smear negative pulmonary TB suspects, a comprehensive clinical and laboratory approach for TB diagnosis using a home-made PCR, as suggested by Flores et al.[32]. Due to the heterogeneity in the test's accuracy, it was emphasized the necessity to incorporate the clinical information for the better evaluation of NAAs in TB diagnosis among smear negative cases[32, 33].

Another possible study limitation was the use of a home-made PCR that may warrant validation in comparison with more reliable techniques, such as an automated standardized test, as described by Greco et al [33]. Unfortunately, an automated test was not available, therefore, the IS6110 element of insertion was used as a target for PCR; as recent meta-analyses demonstrated its higher accuracy in the diagnosis of SNPTB [11].

Differing data in literature may be explained due to some factors. Firstly, few studies have evaluated the utility of the home-made PCR technique among SNPTB suspects in developing nations with a high TB and HIV burden. Secondly, those studies that measured the clinical risk assessment were performed in settings with different TB prevalence [24, 25]. Thirdly, clinical judgment and experience can influence the pretest probabilities, interfering with the sample size in each clinical risk group. Finally, the prevalence of co-morbidities (i.e.: HIV infection) of mycobacteria other than tuberculosis (MOTT) disease and the patient's response to interview may differ according to their prevalence in the community.

Conclusions

The PCR dot-blot used in parallel with the high probability pretest has a high negative predictive value suggesting that in a hospital setting in developing countries, with a high prevalence of TB and HIV, the PCR technique may be useful for the evaluation of SNPTB suspects. For example, when the pretest probability is high, a negative PCR result indicates an increased likelihood of the absence of active TB in SNPTB suspects, infected or not by HIV.

We conclude that our results are in agreement with those of the literature, showing that molecular methods may provide an important contribution to the diagnosis of SNPTB in patients with high clinical suspicion [24, 26]. Since home-made PCR is less costly than automated NAA, this test could be introduced more widely after a proper evaluation of its cost-effectiveness with clinical and radiographic characteristics to refine estimates of likelihood of TB disease in different settings, as proposed by others [28, 34].

Abbreviations:

AFB- Acid Fast Bacilli

MOTT -Mycobacterium Other Than Tuberculosis

MTB- *Mycobacterium tuberculosis*

NAA -Nucleic Acid Amplification

PCR- Polymerase Chain Reaction

PTB- Pulmonary Tuberculosis

SNPTB - Smear Negative Pulmonary Tuberculosis

PRH - Parthenon Reference Hospital

TB –Tuberculosis

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LCS carried out the study, participated in the laboratory tests, participated in data acquisition, performed the statistical analysis and drafted the manuscript; RDS carried out the laboratory tests, data analysis, participated in data acquisition and drafted the manuscript, FCQM helped to draft the manuscript, CJ participated in the recruitment and in the clinical evaluation of patients, PIC underwent the questionnaire in patients. SM and MOR performed bacteriological tests, ARN performed the epidemiological analysis and drafted the paper, MLRR helped design the study, performed the statistical analysis and drafted the paper, ALK conceived of the study, participated in its design, performed the

data analysis, coordination and helped to draft the manuscript. All authors contributed to the interpretation of results, have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Fabio Mendonça and Candice Tosi Michelin for laboratory support; CEARGS (Center of studies in AIDS/ RS) for statistical support; and health personnel from SPRH.

Financial Support: This work was supported by CNPq, REDETB number 62.005/014-PADCT and ICIDR, grant number: 1 U19 AI45432.

References

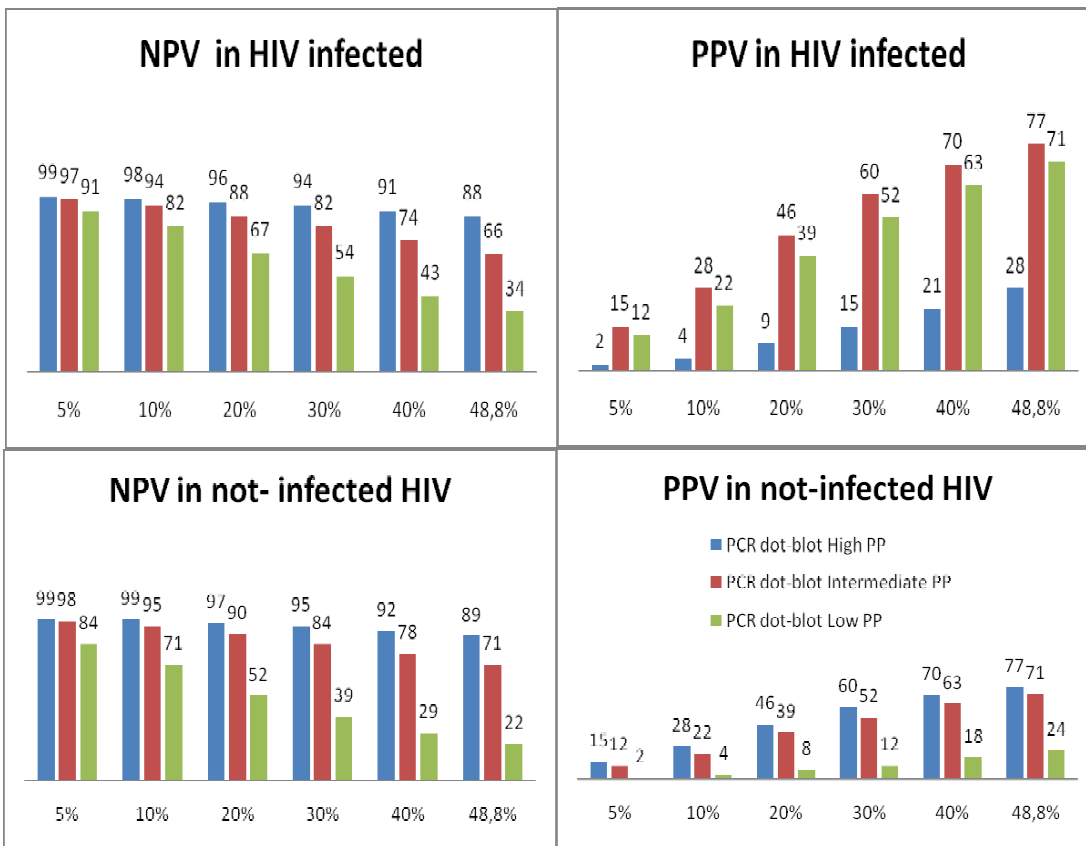
1. WHO: **Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing**
WHO Report 2006 2006:362.
2. Brasil: **Boletim Eletrônico Epidemiológico do Ministério da Saúde**. 2000.
3. Elliott AM, Namaambo K, Allen BW, Luo N, Hayes RJ, Pobee JO, McAdam KP: **Negative sputum smear results in HIV-positive patients with pulmonary tuberculosis in Lusaka, Zambia**. *Tuber Lung Dis* 1993, **74**(3):191-194.
4. Harries AD, Nyangulu DS, Kang'ombe C, Ndalama D, Glynn JR, Banda H, Wirima JJ, Salaniponi FM, Liomba G, Maher D *et al*: **Treatment outcome of an unselected cohort of tuberculosis patients in relation to human immunodeficiency virus serostatus in Zomba Hospital, Malawi**. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998, **92**(3):343-347.
5. Gordin FM, Slutkin G, Schechter G, Goodman PC, Hopewell PC: **Presumptive diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis based on radiographic findings**. *Am Rev Respir Dis* 1989, **139**(5):1090-1093.
6. Dlodlo RA, Fujiwara PI, Enarson DA: **Should tuberculosis treatment and control be addressed differently in HIV-infected and -uninfected individuals?** *Eur Respir J* 2005, **25**(4):751-757.
7. Sloutsky A, Han LL, Werner BG: **Practical strategies for performance optimization of the enhanced gen-probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test**. *J Clin Microbiol* 2004, **42**(4):1547-1551.
8. Schijman AG, Losso MH, Montoto M, Saez CB, Smayevsky J, Benetucci JA: **Prospective evaluation of in-house polymerase chain reaction for diagnosis of mycobacterial diseases in patients with HIV infection and lung infiltrates**. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, **8**(1):106-113.
9. Brodie D, Schluger NW: **The diagnosis of tuberculosis**. *Clin Chest Med* 2005, **26**(2):247-271, vi.
10. Perkins MD: **New diagnostic tools for tuberculosis**. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000, **4**(12 Suppl 2):S182-188.
11. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC: **Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis**. *J Clin Microbiol* 2003, **41**(7):3233-3240.
12. Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, Schuitema A, van Soolingen D, Nganga L, Kibuga D *et al*: **Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus**. *J Clin Microbiol* 2004, **42**(3):1012-1015.

13. Laifer G, Widmer AF, Frei R, Zimmerli W, Fluckiger U: **Polymerase chain reaction for Mycobacterium tuberculosis: impact on clinical management of refugees with pulmonary infiltrates.** *Chest* 2004, **125**(3):981-986.
14. Mbulo GM, Kambashi BS, Kinkese J, Tembwe R, Shumba B, Godfrey-Faussett P, McNerney R: **Comparison of two bacteriophage tests and nucleic acid amplification for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in sub-Saharan Africa.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, **8**(11):1342-1347.
15. Ribeiro FK, Dettoni Vdo V, Peres RL, Vinhas SA, Co TR, Dietze R, Palaci M: **Evaluation of a commercial test based on ligase chain reaction for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2004, **37**(6):431-435.
16. Sperhackle RD, Mello FC, Zaha A, Kritski A, Rossetti ML: **Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, **8**(3):312-317.
17. Tarhan G, Saygan MB, Cesur S, Ocak F, Ceyhan I: **[Retrospective evaluation of Cobas Amplicor system in the rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis complex].** *Mikrobiyol Bul* 2005, **39**(1):35-41.
18. Tuberculose II Consenso Brasileiro de Tuberculose: **Diretrizes Brasileiras para Tuberculose.** *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004, **30**(1).
19. Mello FC, Bastos LG, Soares SL, Rezende VM, Conde MB, Chaisson RE, Kritski AL, Ruffino-Netto A, Werneck GL: **Predicting smear negative pulmonary tuberculosis with classification trees and logistic regression: a cross-sectional study.** *BMC Public Health* 2006, **6**:43.
20. **ATS: Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**(4 Pt 1):1376-1395.
21. Kent PT and Kubica G: **Public Health Mycobacteriology – a guide for level III laboratory.** *Centers for Disease Control and Prevention* 1985.
22. Medronho R.A. Carvalho D.M., Bloch K.V., Luiz R.R., Werneck G.L.: **Epidemiologia.** *Editores Atheneu, Sao Paulo* 2002.
23. Equipe de Controle Epidemiológico. Coordenadoria de Vigilância em Saude. Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre: **Análise comparativa do ingresso de casos novos de Tuberculose ocorrido na rede ambulatorial e hospitalar de Porto Alegre nos anos de 2003 e 2004.** *Boletim Epidemiológico* 2005, **27**(Ano VIII).
24. Catanzaro A, Perry S, Clarridge JE, Dunbar S, Goodnight-White S, LoBue PA, Peter C, Pfyffer GE, Sierra MF, Weber R *et al*: **The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial.** *Jama* 2000, **283**(5):639-645.

25. Lim TK, Gough A, Chin NK, Kumarasinghe G: **Relationship between estimated pretest probability and accuracy of automated Mycobacterium tuberculosis assay in smear-negative pulmonary tuberculosis.** *Chest* 2000, **118**(3):641-647.
26. Piersimoni C, Nista D, Zallocco D, Galassi M, Cimarelli ME, Tubaldi A: **Clinical suspicion as a primary guidance to use commercial amplification tests for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005, **53**(3):195-200.
27. Goessens WH, de Man P, Koeleman JG, Luijendijk A, te Witt R, Endtz HP, van Belkum A: **Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(6):2563-2566.
28. van Cleeff M, Kivihya-Ndugga L, Githui W, Ng'ang'a L, Kibuga D, Odhiambo J, Klatser P: **Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, **9**(8):877-883.
29. Almeda J, Garcia A, Gonzalez J, Quinto L, Ventura PJ, Vidal R, Rufi G, Martinez JA, Jimenez de Anta MT, Trilla A *et al*: **Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, **19**(11):859-867.
30. Lim TK, Mukhopadhyay A, Gough A, Khoo KL, Khoo SM, Lee KH, Kumarasinghe G: **Role of clinical judgment in the application of a nucleic acid amplification test for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis.** *Chest* 2003, **124**(3):902-908.
31. Dowdy DW, Maters A, Parrish N, Beyrer C, Dorman SE: **Cost-effectiveness analysis of the gen-probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test as used routinely on smear-positive respiratory specimens.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(3):948-953.
32. Flores LL, Pai M, Colford JM, Jr., Riley LW: **In-house nucleic acid amplification tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression.** *BMC Microbiol* 2005, **5**:55.
33. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C: **Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis.** *Thorax* 2006, **61**(9):783-790.
34. Lim TK, Cherian J, Poh KL, Leong TY: **The rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis: a cost-effectiveness analysis.** *Respirology* 2000, **5**(4):403-409.

Figure legend

Figure 1 - Simulation of positive and negative predictive values of ZN and Culture/ PCR dot-blot tests, according to different TB prevalence rates.



PPV: Positive Predictive Value, NPV: Negative Predictive Value, PP: pretest probability (clinical suspicion); TB prevalence rates: from 5% to 48.8%

Tables

Table 1 - Patient symptoms and medical history, associated with physicians' clinical suspicion of tuberculosis among smear-negative PTB suspects

Clinical Suspicion of Tuberculosis Group				
Smear-Negative PTB suspects				
Symptoms and Medical History	N= 151 (%)	Low (N=80)	Intermediate (N=25)	High (N=46)
Suggestive chest radiography ^a	42 (27.8%)	0	6	36
Weight loss	81 (53.6%)	37	12	32
Cough	135 (89.4%)	73	23	39
Chest pain	89 (58.9%)	48	15	26
Dyspnea	105 (69.5%)	57	17	31
Tuberculosis exposure at home	74 (49.0%)	37	14	23
Hospital admission in the last 24 months	53 (35.1%)	24	10	19
Hepatitis	31 (20.5%)	12	5	14
Immune suppression ^b	51 (33.8%)	17	13	21

a: intake chest radiograph was suggestive of classical tuberculosis (upper-lobe fibrocavitary) disease

b: includes patients positive for the human immunodeficiency virus (27.2%) and those with a history of steroid use or cancer chemotherapy (3.6%).

Table 2 - Performance of Culture, PCR dot-blot and Clinical suspicion tests, individually and associated, in 151 smear negative PTB suspects.

		All Group ^a				Non previously TB treated Group ^b			
		N=151		N=98					
		TB	Non-TB	TB	Non-TB	TB	Non-TB	TB	Non-TB
		N=43	N=108	N=36	N=62				
Culture	Positive	30	0	27	0				
	Negative	13	108	9	62				
		SE	SP	PPV	NPV	SE	SP	PPV	NPV
		70%	100%	100	89	75%	100%	100	87
PCR dot-blot	Positive	28	18	25	9				
	Negative	15	90	11	53				
		SE	SP	PPV	NPV	SE	SP	PPV	NPV
		65%	83%	61	86	69%	85%	73	83
High PP	Positive	31	15	26	4				
	Negative	12	93	10	58				
		SE	SP	PPV	NPV	SE	SP	PPV	NPV
		72%	86%	67	88	72%	93%	87	85
Intermediate PP	Positive	6	19	6	6				
	Negative	37	89	30	56				
		SE	SP	PPV	NPV	SE	SP	PPV	NPV
		14%	82%	24	71	17%	90%	50	65
Low PP	Positive	6	74	4	52				
	Negative	37	34	32	10				
		SE	SP	PPV	NPV	SE	SP	PPV	NPV
		14%	31%	7.5	48	11%	16%	7.1	24
Table 2B. Performance of methods used in parallel									
Performance of PCR dot-blot in parallel with High Clinical Suspicion		SE	SP	PPV	NPV	SE	SP	PPV	NPV
		90%	71%	75	88	91%	79%	81	90
Performance of PCR dot-blot in parallel with Intermediate Clinical Suspicion		SE	SP	PPV	NPV	SE	SP	PPV	NPV
		70%	68%	68	70	74%	77%	75	76
Performance of PCR dot-blot in parallel with Low Clinical Suspicion		SE	SP	PPV	NPV	SE	SP	PPV	NPV
		26%	25%	47	47	26%	14%	45	34

SE: Sensitivity, SP: Specificity, PPV: Positive Predictive Value, NPV: Negative Predictive Value, PP: pretest probability (clinical suspicion)

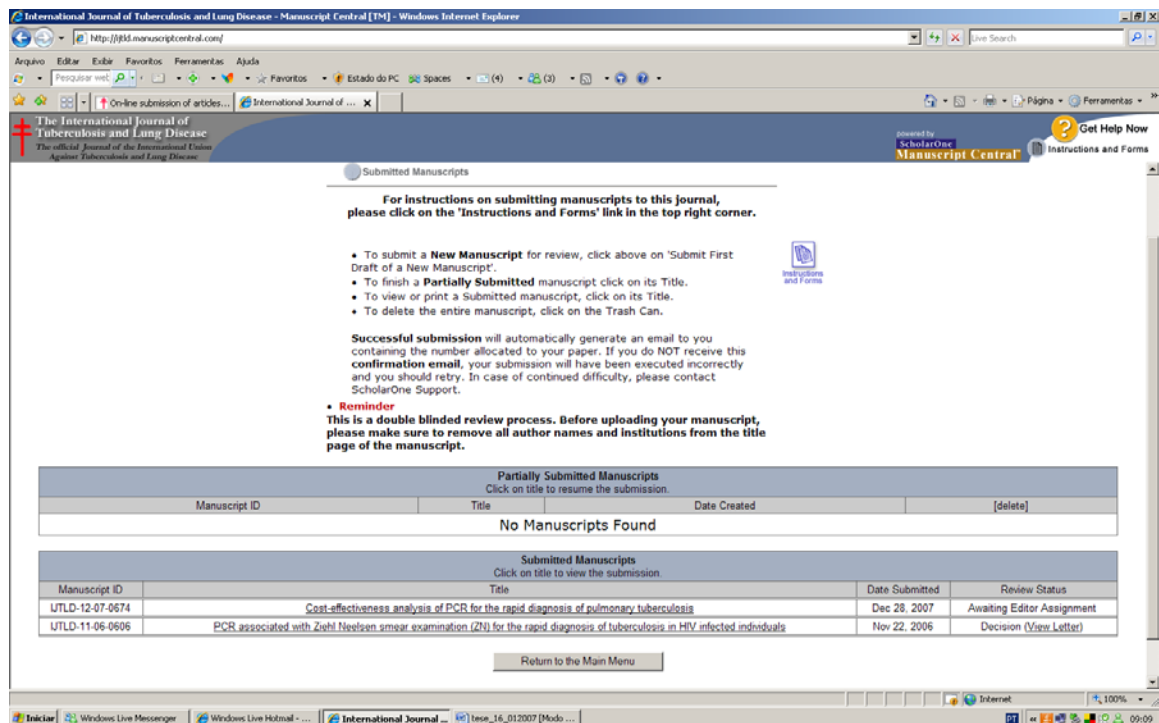
a: All group

b: Non previously TB treated group patients

4.4 Artigo 4

Submetido na revista The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, cujas instruções para os autores estão no anexo 5 (item 9.5.3)

A figura 10 apresenta a confirmação da submissão deste artigo à revista.



The screenshot shows the Manuscript Central interface for The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. It includes instructions for authors on how to submit and manage their manuscripts. Below the instructions, there are two tables: one for 'Partially Submitted Manuscripts' (which is empty) and one for 'Submitted Manuscripts' containing two entries.

Submitted Manuscripts

For instructions on submitting manuscripts to this journal, please click on the 'Instructions and Forms' link in the top right corner.

- To submit a **New Manuscript** for review, click above on 'Submit First Draft of a New Manuscript'.
- To finish a **Partially Submitted** manuscript click on its Title.
- To view or print a Submitted manuscript, click on its Title.
- To delete the entire manuscript, click on the Trash Can.

Successful submission will automatically generate an email to you containing the number allocated to your paper. If you do NOT receive this **confirmation email**, your submission will have been executed incorrectly and you should retry. In case of continued difficulty, please contact ScholarOne Support.

Reminder
This is a double blinded review process. Before uploading your manuscript, please make sure to remove all author names and institutions from the title page of the manuscript.

Partially Submitted Manuscripts			
Click on title to resume the submission.			
Manuscript ID	Title	Date Created	[delete]
No Manuscripts Found			

Submitted Manuscripts			
Click on title to view the submission			
Manuscript ID	Title	Date Submitted	Review Status
UTLD-12-07-0674	Cost-effectiveness analysis of PCR for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis	Dec 28, 2007	Awaiting Editor Assignment
UTLD-11-06-0606	PCR associated with Ziehl Neelsen smear examination (ZN) for the rapid diagnosis of tuberculosis in HIV infected individuals	Nov 22, 2006	Decision (View Letter)

Return to the Main Menu

Figura 10. Comprovação da submissão do artigo

Cost-effectiveness analysis of PCR for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis

Luciene C. Scherer^{1,3} ; Rosa D. Sperhake² ; Antonio Ruffino-Netto⁶ ; Maria L. R.

Rossetti,^{2,3} , Claudia Vater⁴ , Paul Klatser⁵ and Afrânio L. Kritski.⁴

1-Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre/RS/ Brazil;

2- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CDCT, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde- FEPPS/RS) Porto Alegre/RS/Brazil;

3- Universidade Luterana do Brasil-ULBRA, Canoas/ RS/ Brazil;

4- Unidade de Pesquisa em Tuberculose, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UPT/ HUCFF, Instituto de Saúde Coletiva/IESC/Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil;

5 – Royal Tropical Institute (KIT), KIT Biomedical Research – The Netherlands.

6- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo

*From: Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CDCT, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde- FEPPS/RS) Porto Alegre/RS/Brazil;

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Luciene Cardoso Scherer, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CDCT, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde- FEPPS/RS Porto Alegre/RS/Brazil, Av Ipiranga 5400, 3 andar, Centro de Desenvolvimento Científico e tecnológico- CDCT, Porto Alegre CEP 91000000. Phone/fax number 05133520336, Porto Alegre, Brazil.

Email:luciene.scherer@hotmail.com

Running head: Cost-effectiveness analysis of PCR dot-blot

Word count of the text: 2500

Key words: *in house* PCR, HIV, tuberculosis, diagnosis, cost effectiveness

Abbreviation List:

AFB- Acid Fast Bacilli

CHC- Community Health Centers

HIV- Human Immunodeficiency Virus

HIV⁺-HIV seropositive

HIV⁻- HIV seronegative

MOTT -Mycobacterium Other Than Tuberculosis

MTB- *Mycobacterium tuberculosis*

NAA -Nucleic Acid Amplification

NPV- Negative Predictive Value

PCR- Polymerase Chain Reaction

PCR-AG- Polymerase Chain Reaction agarose gel electrophoresis

PCR-dot-blot- PCR colorimetric dot-blot assay

PPV- Positive Predictive Value

PTB- Pulmonary Tuberculosis

SE- Sensitivity

SP- Specificity

PRH - Partenon Reference Hospital

TB –Tuberculosis

Abstract

Setting: A public reference TB/HIV hospital in Brazil.

Objective: To compare the cost-effectiveness of diagnostic strategies for diagnosis of pulmonary TB (PTB): culture and two *in house* PCR tests: PCR-AG and PCR dot-blot, in conjunction with direct microscopy by Ziehl-Neelsen staining (ZN).

Design: From May 2003 to May 2004, sputum was collected consecutively from PTB suspects attending the Parthenon Reference Hospital. Sputum samples were examined with direct microscopy by ZN, culture, PCR-AG and PCR dot-blot. Gold standard was a positive culture combined with the definition of clinical PTB. Cost analysis included health services and patients costs.

Results: Costs per correctly diagnosed case were US\$ 1462, US\$ 1296 and US\$ 1136 for ZN plus culture, ZN plus PCR-AG and ZN plus PCR dot-blot, respectively. ZN plus PCR dot-blot was as cost-effective as ZN plus culture, when cost of treating all correctly diagnosed cases was considered. Cost of the return of all false negatives to health service was more expensive in ZN plus PCR-AG than in other strategies.

Conclusion: This study shows that *in house* PCR (PCR dot-blot) has great potential to be used in hospitals, and can be considered in combination with ZN as an alternative to the diagnosis of PTB.

Background

Tuberculosis (TB) is one of the most important health problems in the world causing 1.8 million deaths each year. The rapid clinical diagnosis and diagnosis is more challenging in patients who have co-morbidities such as Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. Direct microscopy has low sensitivity and culture takes 3 to 6 weeks[1, 2]. Therefore, new tools for TB diagnosis are necessary, especially in health settings with high prevalence of HIV/TB co-infection.

In developing countries, *in house* polymerase chain reaction (PCR) based on amplifying the insertion element *IS6110* is often used for the amplification of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) DNA and offers the potential of a sensitive, specific and rapid diagnostic for diagnosis of pulmonary tuberculosis (PTB) [3-6].

The majority of previous studies evaluated *in house* and automated PCR, reported PCR sensitivities ranging from 77% to 95% and PCR specificities of 95% in smear positive specimens, using culture as the gold standard and clinical criteria only to evaluate the discrepant results. Moreover, the PCR tests were evaluated separately, which is different from clinical practice, where tests for diagnosis, are required in association.[6-8]. Many prior studies note that clinical routine use of PCR may be difficult due to its high cost, mainly if the PCR was used itself and emphasize the clinical importance utility and cost effectiveness analysis for this test as better argument for making such a decision. For regions with high burden of TB and HIV, that urgently needed new strategies for TB control, there are scarce data on cost-effectiveness analysis of PCR technique for TB diagnosis in developing nations [7-13].

The purpose of this study was to measure the cost-effectiveness of *in house* PCR

in conjunction with direct microscopy by Ziehl-Neelsen staining (ZN) for PTB diagnosis, using as gold standard (the combination of positive culture with the clinical definition of PTB.

Study population and Methods

From May 2003 to May 2004, subjects were recruited at the Partenon Reference Hospital (PRH) of Rio Grande do Sul State in South of Brazil. Clinical and final diagnoses of PTB cases were based on the review of clinical evaluation 6 months post diagnosis. Chest physicians were blinded to PCR results. Participants underwent a standardized and validated interview, which included demographic information and clinical history and written informed consent was obtained. HIV status was screened by serology (GenScreen HIV Plus® BioRad), and confirmed by Western blotting (Genelabs® Diagnostics) at the laboratory hospital.

Examinations and performance evaluation

All sputum specimens were sent to the State Public Reference Laboratory, for analysis. ZN, Culture and two *in house* PCR techniques were performed following the routine of laboratory [14]. The extraction and amplification of DNA, for PCR assays: colorimetric test (PCR dot-blot) and agarose gel test (PCR-AG) were performed as previously published [7, 15]. Positive (MTB Mt H37Rv) and negative controls (PCR mixture with water instead of template DNA) were included for each set of PCR. To detect specimen inhibitors in negative results, a tube of PCR mix for each specimen was spiked with purified DNA target[7]. The gold standard was the combination of positive culture with clinical definition of pulmonary TB. Clinical and final diagnosis of confirmed PTB cases was defined as those with a positive culture for MTB in the respiratory specimen; presumptive PTB, as clinical improvement after six months of anti-TB treatment, as judged by three different chest physicians not involved in this study in a

blinded manner. Non-PTB was considered when patients were negative in acid-fast smear and MTB culture, and did not present clinical and chest radiographic changes compatible with PTB after six months of follow-up.

Costs

The cost components for each procedure included costs incurred by the patient, labor costs, drugs, consumables and equipment costs. Number and level of staff screening for TB in hospital were considered the same in all strategies. Clinical, radiological and laboratory staff costs were calculated from salary base of Rio Grande do Sul State of Brazil. For each procedure there were attributed costs based on procedures costs of Brazilian Public Health System. All costs were expressed in US\$, using an exchange rate of US\$ 1= 3 R\$ (REAIS), the average range exchange rate from 2003 to 2004. In the treatment costs analysis the cost related to: a) the inadequate use of non anti-TB drugs and; b) the adverse effects to the inadequate use of anti-TB drugs for nonTB subjects, were not included.

Cost effectiveness

A decision analytic model was developed using the software Excel 7.0 to compare the routine diagnostic procedure for diagnosis of PTB using ZN methods in the sputum specimens with a theoretical combination of procedures using ZN plus culture, ZN plus PCR-AG, and ZN plus PCR dot blot. The cost effectiveness was expressed as cost per correctly diagnosed case of TB, cost per case correctly diagnosed and treated, including treatment of incorrectly diagnosed cases, and cost per case incorrectly diagnosed and not treated. A sensitivity analysis was performed to assess to what extent changes in certain environmental factors would affect cost-effectiveness.

Results

A total of 277 TB suspects were enrolled. Prevalence of PTB was 46.2% (128/277) overall and 54.0% (40/74) among HIV infected subjects.

Test performance

Table 1 shows the yield and performance of each combined procedure in detecting a PTB case. The positive (LR+) and negative (LR-) likelihood ratios were 47 and 0.07 for ZN plus culture, and 5.65 and 0.12 for ZN plus PCR-dot-blot, respectively. The inhibition of two *in house* PCR was 1.9%. Twenty-three specimens presented less than 50 CFU in culture, which is below the detection limit of the PCR. These specimens were included in the analysis.

Costs

Table 2A shows the costs at the health service level and Table 2B shows costs due to laboratory investment. The ZN plus *In house* PCR strategies (PCR-AG and PCR dot-blot) strategy requires the largest laboratory investment for equipment (US\$ 26,667). Table 2C shows costs incurred by patients.

Table 3A shows the total cost of screening 1,000 suspects. When considering total screening costs were considered ZN plus PCR dot blot costs were similar to ZN plus Culture costs (US\$ 120,591 versus US\$ 162,300).

Table 3B shows the total cost (in US\$) of treatment of 1000 suspects. When considering total cost related to the treatment (inpatients plus outpatients) per strategy, ZN plus PCR dot-blot was 1.4 times less expensive than ZN plus Culture strategy (US\$ 665 versus US\$ 910).

Table 4 shows the cost-effectiveness expressed for total number correctly diagnosed cases of TB in screening of 1,000 TB suspects. ZN plus PCR dot-blot costs were 1.3 times cheaper than ZN plus Culture costs.

Table 5 shows that the cost-effectiveness of screening 1,000 suspects for ZN plus PCR dot-blot was as cost-effective than the strategy of ZN plus Culture (US\$1,611 vs US\$2,359), when the costs of treating all correctly diagnosed cases were considered. However, the cost of treating all falsely diagnosed cases was 16 times more expensive than ZN plus Culture.

Considering the similar costs between the ZN plus Culture and ZN plus PCR dot blot, the Table 6 shows a sensitivity analysis comparing the cost-effectiveness of the two strategies, adjusting for different features. The ratio of cost-effectiveness was higher than 0.78 in most adjustments. Considering high prevalence of TB 60%, PCR dot-blot was 1.3 times cheaper than current situation (Prevalence 46%). Considering low prevalence of TB (10%), PCR dot-blot was 5 times more expensive than current situation, but the costs decreased with the increase of the prevalence of TB. On reduction of the running cost of PCR dot-blot by 22%, the cost-effectiveness was similar with ZN plus Culture.

Discussion

The approach of comparing more sensitive techniques, like PCR, to rapid, low cost techniques, like ZN could improve the quality of diagnosis and reduce delayed identification of mycobacterial infections. This is especially crucial among hospitalized PTB suspects, in which the atypical clinical presentation and mortality rate are more frequent, and sometimes is difficult to obtain multiple respiratory specimens [8, 18].

Additionally, ZN alone cannot distinguish TB from mycobacteria other than TB (MOTT) [19]. In this study, in a setting with a high prevalence of TB/HIV (54.0%), we evaluated sensitivity, specificity, likelihood ratios, predictive values and compared the cost-effectiveness of strategies ZN plus Culture, ZN plus PCR-AG and ZN plus PCR dot-blot for diagnosis of PTB [20].

Although, the ZN plus culture strategy showed the highest performance for PTB diagnosis, ZN plus PCR dot blot strategy had a negative predictive value (87%) and low likelihood ratio negative (0.12) similar to ZN plus Culture (90%, 0.07), respectively. Suggesting that this strategy could be the alternative for rapid TB diagnosis, including HIV infected individuals, where it is critical to initiate prompt, specific treatment and a delayed diagnosis can be lethal. Additionally, this strategy could reduce the risk of dissemination and spread to other hospitalized patients and health care personnel.[1, 21]

The specificity of ZN plus PCR dot-blot (84%) was similar to a series described (84% to 87%) in developing countries even using automated nucleic acid amplification tests (NAA) and lower than that described (>95%) in industrialized countries[6, 18, 22]. The lower specificity of ZN plus PCR-AG (76%) was similar to values published previously using PCR [23].

The low sensitivities found in ZN plus PCR-AG (72%) and ZN plus PCR dot-blot (85%) may be due to the presence of inhibitors that remain in the specimen after the extraction procedure, or a small number of mycobacteria unequally distributed in the test suspension or existing the below detection limit of both *in house* PCR tests(PCR dot blot and PCR-AG) (50 CFU)[7]. Among false negative results, we had 42.9% (15/35) in PCR-

AG; 57.9% (11/19) in PCR dot-blot, that were below the detection limit of amplification test. The proportion of inhibitors was (1.9%) to *in house* PCR, similar to those used in NAA tests (0.85% to 22.7%) [9, 22] The low copy numbers of IS6110 (insertion element) in MTB, is reported as a factor of decreased of sensitivity, but it has not been reported in Brazil [24].

However to make rational decisions about the implementation of *in house* PCR in the medical routine, cost-effectiveness studies are essential. Such studies give insight to the composition of different cost components, which may be the most important factor from the patient and the health service's perspectives. Here we compared the cost-effectiveness of ZN to the *in house* PCR with ZN and the Culture on the first sputum specimen collection, including staff costs, using as a gold standard culture and clinical evolution, different to the cost-effectiveness analysis described by van Cleef et al in a reference ambulatory in Kenya, where only culture for mycobacteria was used as gold standard [8].

In our study, we found less cost-effectiveness using ZN plus PCR per case correctly diagnosed compared to that described earlier using theoretical model for automated PCR (Amplicor MTB PCR and amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct test (MTD- Gen-Probe), probably due to lower accuracy observed with the *in house* PCR techniques [19,25]. In the present study, we used a more conservative approach when it was included in the analysis, health service and patient cost. The cost-effectiveness per case correctly diagnosed to strategy ZN plus PCR dot-blot was higher than the strategy ZN plus Culture (ratio of 0.78). ZN plus PCR dot-blot turned out to be 1.3 times the cost of ZN plus Culture. The costs for every correctly diagnosed TB patient are 1.3 times

lower in ZN plus PCR dot-blot than in ZN plus Culture, similar to described previously to automated PCR (ratio of 1.8) where it was compared to PCR with the smear microscopy routine.[8]. When considering only patient costs, the ZN plus PCR dot-blot was more cost-effective than ZN plus culture with ratio of 0.7.

The cost-effectiveness per case correctly diagnosed and treated, including treatment of falsely diagnosed cases in ZN plus PCR dot-blot, was higher than the strategy ZN plus Culture (ratio of 0.81). And, the cost-effectiveness per case incorrectly diagnosed and non treated in ZN plus PCR dot-blot, was higher than the cost-effectiveness per case correctly diagnosed to strategy ZN plus Culture (ratio of 0.95).

The over diagnosis due to the low specificity of the *in house* PCR, might indeed be a barrier in the decision to invest in these tests. However, in our study, we evaluated two *in house* PCR, ZN plus PCR dot-blot was more cost-effective than ZN plus PCR-AG, and it was as cost-effective than ZN plus Culture, confirming the potential of some *in house* PCR in routine diagnosis for PTB [9, 26-28]. Another reason to use the *in house* PCR is that ZN plus Culture is time consuming and labor intensive. Additionally, PCR method is patient friendly, reducing costs to patients and PCR is not influenced by HIV status of the patient [18, 19].

Middle income countries, like Brazil have to consider the economic burden of managing false negative results. The cost treating return false negative patients was more expensive for ZN plus PCR-AG than ZN plus PCR dot-blot and it was similar to ZN plus Culture. Some studies reported the importance of considering costs of false negative patients, but the cost was not indicated [8, 25]. When these costs were associated to total

screening costs, the costs for each incorrectly diagnosed and not treated were thus 1.2 times higher in ZN plus PCR dot-blot in comparison to ZN plus Culture strategy.

The sensitivity analysis comparing the cost-effectiveness of ZN plus Culture and ZN plus PCR dot-blot, adjusting different scenarios for TB prevalence, shows that the ratio of cost-effectiveness remained more or less the same in most adjustments. Some gains in cost-effectiveness can be obtained when the sensitivity and specificity of PCR were adjusted to 95%, according to results reported previously which state that sensitivity higher than 80% can be a factor to increase cost-effectiveness of PCR methods [25].

In reduction in the cost of PCR dot-blot for US\$ 10 per test we also have an increment on the cost-effectiveness of the ZN plus PCR dot-blot strategy. It was similar to the method described for others when cost of PCR is reduced [8, 18, 19, 25]. And, it is expected that the cost can be reduced with time and increased the utilization[29]. *In house* PCR tests are estimated to cost about US\$ 5-10. A price reduction to US\$6 would adjust the cost effectiveness of PCR to the same level of smear microscopy [25].

The cost-effectiveness of the ZN plus PCR dot-blot strategy described in this study was similar to other strategies when lower TB prevalence made PCR more expensive for diagnosis of PTB [8, 25].

In conclusion our study showed that, the strategy of ZN plus PCR dot-blot, using the respiratory specimen can be a cost-effective alternative, especially in hospitals from developing nations with high prevalence of TB and HIV. ZN plus PCR dot-blot showed a great improvement in sensitivity, negative predictive value, and offered an improvement for ruling out pulmonary TB diagnosis. However, inter laboratory and cost-effectiveness

studies in others settings are required to evaluate the performance of PCR dot-blot under field conditions, before it be introduced for routine use.

Acknowledgments. CEARGS, PRH and REDE-TB for support

References

1. Sharma SK, Mohan A, Sharma A, Mitra DK: Miliary tuberculosis: new insights into an old disease. *Lancet Infect Dis* 2005, 5(7):415-430.
2. WHO: Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing
WHO Report 2006 2006:362.
3. Schijman AG, Losso MH, Montoto M, Saez CB, Smayevsky J, Benetucci JA: Prospective evaluation of in-house polymerase chain reaction for diagnosis of mycobacterial diseases in patients with HIV infection and lung infiltrates. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, 8(1):106-113.
4. Brodie D, Schluger NW: The diagnosis of tuberculosis. *Clin Chest Med* 2005, 26(2):247-271, vi.
5. Perkins MD: New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000, 4(12 Suppl 2):S182-188.
6. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC: Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003, 41(7):3233-3240.
7. Sperhake RD, Mello FC, Zaha A, Kritski A, Rossetti ML: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, 8(3):312-317.
8. van Cleeff M, Kivihya-Ndugga L, Githui W, Ng'ang'a L, Kibuga D, Odhiambo J, Klatser P: Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, 9(8):877-883.

9. Almeda J, Garcia A, Gonzalez J, Quinto L, Ventura PJ, Vidal R, Rufi G, Martinez JA, Jimenez de Anta MT, Trilla A et al: Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, 19(11):859-867.
10. Flores LL, Pai M, Colford JM, Jr., Riley LW: In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol* 2005, 5:55.
11. Portillo-Gomez L, Morris SL, Panduro A: Rapid and efficient detection of extra-pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000, 4(4):361-370.
12. Rossetti ML, Valim AR, Silva MS, Rodrigues VS: [Resistant tuberculosis: a molecular review]. *Rev Saude Publica* 2002, 36(4):525-532.
13. Soini H, Agha SA, El-Fiky A, Viljanen MK: Comparison of amplicor and 32-kilodalton PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1996, 34(7):1829-1830.
14. Kent PT and Kubica G: *Public Health Mycobacteriology – a guide for level III laboratory*. Centers for Disease Control and Prevention 1985
15. Rossetti L R JSB, Rodrigues V F S, Moura A R, Oliveira H, Zaha A: Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J Microbiol Meth* 1997, 28:139-146.
16. Kritski AL: *Tuberculose do Ambulatório a Enfermaria*. Atheneu 2000, 2 ed.
17. *Tuberculose II Consenso Brasileiro de Tuberculose:: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose*. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004, 30(1).

18. Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, Schuitema A, van Soolingen D, Nganga L, Kibuga D et al: Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 2004, 42(3):1012-1015.
19. Dowdy DW, Maters A, Parrish N, Beyrer C, Dorman SE: Cost-effectiveness analysis of the gen-probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test as used routinely on smear-positive respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2003, 41(3):948-953.
20. Equipe de Controle Epidemiológico/Coordenadoria de Vigilância em Saúde/Secretaria Municipal de Porto Alegre 2005: Análise comparativa do ingresso de casos novos de Tuberculose ocorrido na rede ambulatorial e hospitalar de Porto Alegre nos anos de 2003 e 2004. *Boletim Epidemiológico* 2005, 27(Ano VIII).
21. Keshinro B, Diul MY: HIV-TB: epidemiology, clinical features and diagnosis of smear-negative TB. *Trop Doct* 2006, 36(2):68-71.
22. Goessens WH, de Man P, Koeleman JG, Luijendijk A, te Witt R, Endtz HP, van Belkum A: Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2005, 43(6):2563-2566.
23. Dilworth JP, Goyal M, Young DB, Shaw RJ: Comparison of polymerase chain reaction for IS6110 and Amplicor in the diagnosis of tuberculosis. *Thorax* 1996, 51(3):320-322.

24. Cafrune PI, Riley LW, Possuelo LG, Valim AR, Borges M, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A: Recent transmission of tuberculosis involving retired patients. *J Infect* 2006.
25. Roos BR, van Cleeff MR, Githui WA, Kivihya-Ndugga L, Odhiambo JA, Kibuga DK, Klatser PR: Cost-effectiveness of the polymerase chain reaction versus smear examination for the diagnosis of tuberculosis in Kenya: a theoretical model. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998, 2(3):235-241.
26. Kivihya-Ndugga LE, van Cleeff MR, Githui WA, Nganga LW, Kibuga DK, Odhiambo JA, Klatser PR: A comprehensive comparison of Ziehl-Neelsen and fluorescence microscopy for the diagnosis of tuberculosis in a resource-poor urban setting. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003, 7(12):1163-1171.
27. Hazbon MH: Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. *Biomedica* 2004, 24 Supp 1:149-162.
28. Mitarai S, Kurashima A, Tamura A, Nagai H, Shishido H: Clinical evaluation of Amplicor Mycobacterium detection system for the diagnosis of pulmonary mycobacterial infection using sputum. *Tuberculosis (Edinb)* 2001, 81(5-6):319-325.
29. Catanzaro A, Perry S, Clarridge JE, Dunbar S, Goodnight-White S, LoBue PA, Peter C, Pfyffer GE, Sierra MF, Weber R et al: The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial. *Jama* 2000, 283(5):639-645.

Table 1. Sensitivities, specificities and likelihood ratios of PCR-AG, PCR dot-Blot, ZN and Culture.

Laboratory Results and Performance of methods ^a		Total number of suspects N=277			
		TB N=128		Non-TB N=149	
Performance of ZN	Positive	77		1	
	Negative	51		148	
		SE 60%	SP 99%	LR+ 60	LR- 0.4
Performance of ZN plus Culture	Positive	111		1	
	Negative	17		148	
		SE 87%	SP 99%	LR+ 47	LR- 0.07
Performance of ZN plus PCR dot - blot	Positive	109		22	
	Negative	19		127	
		SE 85%	SP 84%	LR+ 5.65	LR- 0.12
Performance of ZN plus PCR-AG	Positive	93		35	
	Negative	35		114	
		SE 72%	SP 76%	LR+ 3.11	LR- 0.30

SE: Sensivity, SP: Specificity, LR+: Positive Likelihood Ratio, LR-: Negative Likelihood Ratio.

^aThe performance of tests was calculated using specific formulas utilized by parallel tests: sensitivity (SE) of ZN with culture: $(SE_{zn} + SE_{culture}) - (SE_{zn} \times SE_{culture})$, specificity (SP) of ZN with culture: $SP_{zn} \times SP_{culture}$, predictive values (PV) and likelihood ratio (LR), according to literature [22].

Table 2. Costs in US\$ of TB diagnosis in Brazil.

A. Health service costs				
	Staff Number	Salaries of all staff per year (US\$)	Staff Cost per day (US\$)	Time spent to have access for result (days)
ZN	2	9,260	39	1
ZN plus Culture	2	9,260	116	3
ZN plus PCR-AG	2	9,260	77	2
ZN plus PCR-dot-blot	2	9,260	77	2
B. Labour costs				
	Equipment (US\$)	Annualisation Years	Running costs per 1000 suspects (US\$)	Running costs per examination (US\$)
ZN^a	4,333	5	1,003	1.00
ZN plus Culture^b	22,667	5	12,333	12.33
ZN plus PCR-AG^c	26,667	5	11,167	11.16
ZN plus PCR-dot-blot^c	26,667	5	12,833	12.83
C. Estimated costs incurred by patients, including costs for travel, food and income loss^d				
	ZN (US\$)	ZN plus Culture (US\$)	ZN plus PCR-AG (US\$)	ZN plus PCR dot-blot (US\$)
Travel	800	2,400	1,600	1,600
Food	3,333	10,000	6,667	6,667
Income Loss	5,833	17,500	11,667	11,667
Total patients Cost	9,967	29,900	19,933	19,933

^aMicroscopic ^b Microscopic and Laminar Flow Cabinets ^cThermocycler, reader, Centrifuge and Laminar Flow Cabinets

^d Income loss of patients was calculated from monthly salary base of Brazil (US\$117) and was based on proportional days spent by patients for to have access to the result of each laboratory procedure. Travel cost was considered US\$0.8 one way. Food was considered US\$3.3 per meal. Base salary in Brazil was considered (US\$5.83 per day). Staff costs in the laboratory were based on proportional days spent in each laboratory procedure. Costs of consumables and equipment were provided by the program as well as by manufacturer. We annualized the capital cost of the equipment for 5 years. For PCR capital costs included the cost of thermo cycler, reader and centrifuge. Building costs were not included. Patient costs were estimated using the average of two trials for PCR procedure and three trials for ZN and culture procedures.

Table 3A. Costs (in US\$) of screening 1000 TB suspects comparing ZN, ZN plus Culture, ZN plus PCR-AG, ZN plus PCR dot- blot.

3A. Health Service Costs				
	ZN	ZN plus Culture	ZN plus PCR-AG	ZN plus PCR dot-blot
Total cases TB	128	128	128	128
Cost Component per 1000 TB suspects	(US\$)	(US\$)	(US\$)	(US\$)
Laboratory Cost				
Labour Costs	1,400	3,283	11,400	US\$13,067
Investment costs	72	1,349	258	258
Running costs	1,003	12,333	11,167	12,833
Total Laboratory Cost	2,475	US\$16,966	22,825	26,158
Staff per year^b				
Laboratory technician	2,860	2,860	2,860	2,860
Clinical Laboratory and Molecular Biology technologists	6,400	6,400	6,400	6,400
Cost staff per strategy per day	39	116	77	77
Total cost Staff per time spent per 1000 samples	38,583	115,750	77,167	77,167
Total Treatment Costs (inpatients plus outpatients)^c	421	910	665	665
Total Health Service Costs	41,479	132,400	100,657	103,926
Patient Cost^d				
Travel	800	2,400	1,600	1,600
Food	3,333	10,000	6,667	6,667
Income Loss	5,833	17,500	11,667	11,667
Total Patient Costs	9,967	29,900	19,933	19,933
Total Screening Costs	51,446	162,300	120,591	123,859

^a For each procedure there were attributed costs based on procedures costs of Brazilian Public Health System. (For ZN US\$ 1.4 and Culture US\$ 1.9) ,and from CDCT/FEPPS (for PCR-AG US\$ 10 and PCR dot-blot US\$ 11.7), assuming investment laboratory equipment for 5 years ;

^bStaff salary was considered for laboratory technician US\$2860 per year, for Laboratory technologist US\$6400 per year.Staff costs in the laboratory were based on proportional days spent in each laboratory procedure;

^c The days of internation in the hospital was considered the same days spent in each laboratory procedure. The time spent in each laboratory procedure to have access for the result of the laboratory technique were assumed to be one day for ZN, two days for ZN plus *in house* PCR (PCR-AG and PCR dot blot), and 3 days for ZN plus culture. Total treatment included clinical officer and hospital costs, assuming cost per pill US\$ 0.22, using 3 pills for day, during 180 days, hospital room costs US\$ 4.16/day , costs with salary of staff clinical, clinical consult cost US\$2,52 per patient, nurse clinical consult US\$2,52 per patient. Assuming that during the treatment (4 months) were performed 4 ZN e 4 RX, following Brazilian recommendations for treatment [17];

^d travel, food and income loss for strategies ZN was considered 1 days, for strategies ZN plus Culture was considered 3 days, for ZN plus PCR-AG and ZN plus PCR dot-blot 2 days. The health service costs analysis was based on processing 50 ZN slides, 86 samples for each *in house* PCR and 14 cultures per day. ZN plus culture and *in house* PCR were performed by two trained staff, respectively. Costs of chest physicians were considered the same for all strategies. Running costs were calculated from investments required to examine 1000 smears.

Table 3 B1. Costs (in US\$) of treatment of 1000 TB suspects comparing ZN, ZN plus Culture, ZN plus PCR-AG, ZN plus PCR dot- blot.

3B1. Treatment Costs	ZN	ZN plus Culture	ZN plus PCR-AG	ZN plus PCR dot-blot
Total cases TB diagnosed	77	111	93	111
Cost of Treatment per 1000 TB suspects	(US\$)	(US\$)	(US\$)	(US\$)
Total Treatment Costs	421	910	665	665
Costs related to the treatment of outpatients^a				
Antibiotics	88	88	88	88
Staff^b				
Nurse	6,400	6,400	6,400	6,400
Clinical physician	6,400	6,400	6,400	6,400
Cost of staff per strategy per day	53	160	107	107
Health Service Costs				
Clinical Physician Consult	3	8	5	5
Nurse Consult	3	8	5	5
Cost of consult per strategy per day	5	15	10	10
RX Staff				
Radiologist	6,400	6,400	6,400	6,400
RX technician	2,860	2,860	2,860	2,860
Costs of RX staff per strategy per day	39	116	77	77
Diagnostic Service				
ZN (6 times)	8	8	8	8
RX (6 times)	19	19	19	19
Costs of diagnostic service per strategy	27	82	55	55
Total cost related to the treatment of outpatients per strategy	213	461	337	337

^aThe days of internation in the hospital was considered the same days spent in each laboratory procedure. The time spent in each laboratory procedure to have access for the result of the laboratory technique were assumed to be one day for ZN, two days for ZN plus *in house* PCR (PCR-AG and PCR dot blot), and 3 days for ZN plus culture.

Total treatment included clinical officer and hospital costs, assuming cost per pill US\$ 0.22, using 3 pills for day, during 180 days, hospital room costs US\$ 4.16/day, costs with salary of staff clinical, clinical consult cost US\$2,52 per patient, nurse clinical consult US\$2,52 per patient.

Assuming that during the treatment (4 months) were performed 4 ZN e 4 RX, following Brazilian recommendations for treatment [17];

^bStaff salary was considered for clinical physician, nurse and radiologist were US\$6400 per year, for RX technician was US\$2860 per year. The days of internation in the hospital was considered the same days spent in each laboratory procedure.

Table 3 B2. Costs in US\$ of treatment of 1,000 TB suspects comparing ZN, ZN plus Culture, ZN plus PCR-AG, ZN plus PCR dot-blot.

3B2. Treatment Costs				
	ZN	ZN plus Culture	ZN plus PCR-AG	ZN plus PCR dot-blot
Costs related to the treatment of inpatients^a	(US\$)	(US\$)	(US\$)	(US\$)
Antibiotics	88	88	88	88
Staff^b				
Nurse	6,400	6,400	6,400	6,400
Clinical physician	6,400	6,400	6,400	6,400
Cost of staff per strategy per day	53	160	107	107
Health Service Costs				
Clinical Physician Consult	3	8	5	5
Nurse Consult	3	8	5	5
Cost of consult per strategy per day	5	15	10	10
RX Staff				
Radiologist	6,400	6,400	6,400	6,400
RX technician	2,860	2,860	2,860	2,860
Costs of RX staff per strategy per day	39	116	77	77
Diagnostic Service				
ZN (4 times)	6	6	6	6
RX (4 times)	13	13	13	13
Costs of diagnostic service per strategy	19	57	38	38
In patient evaluation				
Isolated hospital room per day	4	12	8	8
Total cost related to the treatment of inpatients per strategy	208	448	328	328

^aThe days of internation in the hospital was considered the same days spent in each laboratory procedure. The time spent in each laboratory procedure to have access for the result of the laboratory technique were assumed to be one day for ZN, two days for ZN plus *in house* PCR (PCR-AG and PCR dot blot), and 3 days for ZN plus culture.

Total treatment included clinical officer and hospital costs, assuming cost per pill US\$ 0.22, using 3 pills for day, during 180 days, hospital room costs US\$ 4.16/day, costs with salary of staff clinical, clinical consult cost US\$2.52 per patient, nurse clinical consult US\$2,52 per patient. Assuming that during the treatment (4 months) were performed 4 ZN e 4 RX, following Brazilian recommendations for treatment [17].

^bStaff salary was considered for clinical physician, nurse and radiologist were US\$6400 per year, for RX technician was US\$2860 per year. The days of internation in the hospital was considered the same days spent in each laboratory procedure.

Table 4 Cost-effectiveness of screening 1000 TB suspects comparing ZN, ZN plus Culture, ZN plus PCR-AG, and ZN plus PCR dot- blot.

Cost Component per 1 000 TB suspects				
	ZN	ZN plus Culture	ZN plus PCR-AG	ZN plus PCR dot-blot
Total number correctly diagnoses cases of TB	77	111	93	109
	(US\$)	(US\$)	(US\$)	(US\$)
Total Screening Costs	51,446	162,300	120,591	123,859
Total Health Service Costs	41,479	132,400	100,657	103,926
Total Patient Costs	9,967	29,900	19,933	19,933
Cost per correctly diagnosed case of TB				
Screening Costs	668	1462	1297	1136
Health Service Costs	539	1193	1082	953
Patient Cost	129	269	214	183

Table 5. Costs involved in US\$ and cost-effectiveness of screening 1000 TB suspects and costs of return of false negatives patients for society

	ZN	ZN plus Culture	ZN plus PCR-AG	ZN plus PCR dot-blot
A. Cost per case correctly diagnosed and treated				
Total number correctly diagnoses cases of TB	77	111	93	109
False positives	1	1	35	22
	(US\$)	(US\$)	(US\$)	(US\$)
Total Screening Costs	51,446	162,300	120,591	123,859
Cost of treating all correctly diagnosed cases ^a	32,421	10,992	61,886	72,534
Cost of treating all falsely diagnosed cases ^a	421	910	23,291	14,640
Cost per case correctly diagnosed and treated ^b	1,081	2,359	1,608	1,611
B. Cost per case incorrectly diagnosed and non treated				
Total number correctly diagnoses cases of non TB	148	148	114	127
False negatives	51	17	35	19
Estimative of false negatives in 1000 TB suspects	398	133	273	148
Estimative of transmission of false negatives in 1000 TB suspects	3980	1330	2730	1480
	(US\$)	(US\$)	(US\$)	(US\$)
Cost of all falsely diagnosed non cases	2,624	2,759	4,221	2,353
Cost of return all false negatives to health service ^c	204,980	215,555	239,740	183,854
Cost of false negatives per patient	51	162	121	124
Total Costs	256,478	378,017	450,451	307,837
Cost per case incorrectly diagnosed and non treated	4,985	2,329	3,735	2,485

^aCost of treating one case is US\$421, US\$910, US\$665, for ZN, ZN plus Culture, and ZN plus PCR-AG and ZN plus PCR-dot-blot, respectively. ^bincluding treatment of falsely diagnosed cases, ^cassuming that one false negative transmit TB to 10 individuals [16].

Table 6. Sensitivity analysis based on screening of 1000 suspects comparing ZN, ZN plus Culture, ZN plus PCR-AG, ZN plus PCR dot-blot.

Component	Current situation	Adjustment	Cost per correctly diagnosed case of TB			Cost per case correctly diagnosed and treated, including treatment of falsely diagnosed cases			Cost per case incorrectly diagnosed and non treated		
			ZN plus Culture	ZN plus PCR dot-blot	Ratio	ZN plus Culture	ZN plus PCR dot-blot	Ratio	ZN plus Culture	ZN plus PCR dot-blot	Ratio
TB prevalence	46%	No adjustment	(US\$)	(US\$)		(US\$)	(US\$)		(US\$)	(US\$)	
			1,462	1,136	0.78	2,380	1,936	0.81	2,554	US\$2,424	0.95
			6,726	5,227	0.78	10,949	8,906	0.81	1,495	1,215	0.81
			3,363	2,614	0.78	5,474	4,453	0.81	1,653	1,341	0.81
			1,681	1,307	0.78	2,737	2,226	0.81	2,095	1,689	0.81
			1,121	871	0.78	1,825	1,484	0.81	2,859	2,283	0.80
Sensitivity PCR dot-blot Specificity PCR dot-blot PCR dot-blot running costs ^a	85%	95%	1,330	1,015	0.76	2,166	1,730	0.80	3,098	2,523	0.81
			1,143	872	0.76	231	242	1.00	2,662	2,167	0.81
			1,192	927	0.78	2,380	910	0.38	2,554	2,368	0.93
			US\$12833	US\$10000							

^a assuming that PCR dot-blot could be decreased running costs in 22%

5 Discussão

5.1 Dados Epidemiológicos da população estudada

Neste estudo se observou uma prevalência elevada de Tuberculose Pulmonar ativa (46%) com taxa de co-infecção HIV/TB (27%), como é apresentado em todos os artigos que compõem esta tese. Estes dados estão de acordo com os dados relatados pelo Controle do Programa de Porto Alegre e estimados pela OMS, e estão acima dos dados relatados pelo Ministério da Saúde do Brasil, provavelmente em função das deficiências nacionais do sistema de notificação.(Brasil, 2005; ECE/CGVS, 2005; WHO, 2006).

5.2 Análise de Sinais e Sintomas Clínicos associados em pacientes infectados ou não por HIV

Como foi discutido e mostrado através da tabela 1 no artigo 1 e no artigo 3 os mais consistentes fatores preditores para Tuberculose Pulmonar foram a cultura positiva e Raio-X compatível com doença ativa, mas nos pacientes infectados pelo HIV isto não foi significativo, como é mostrado na tabela 1 do artigo 1. Estes dados foram confirmados pela literatura uma vez que pacientes com infecção por HIV muitas vezes apresentam resultados radiológicos atípicos (Schijman et al., 2004).

5.3 Sensibilidades e Especificidades das técnicas de PCR *in house* para o diagnóstico de TB pulmonar

Os artigos 1, 2 e 3 apresentam dados que discutem a performance das técnicas de PCR *in house* (PCR dot-blot (método colorimétrico) and PCR-AG (método não colorimétrico), com diferentes olhares, um mais metodológico no sentido de comparar diferentes métodos de detecção para o PCR *in house*, outro no sentido de avaliar a utilização da técnica de PCR *in house* com as técnicas convencionais de diagnóstico e um mais clínico, com a expectativa de avaliar a utilização da técnica de PCR *in house* com a suspeita clínica do médico.

O artigo 1, com olhar metodológico, aponta os resultados da comparação das metodologias de PCR *in house*, estratificando esta avaliação em diferentes grupos. Os resultados do artigo 1, mostrados na tabela 2, apontam que as sensibilidades do PCR dot-blot variaram de 63% a 76% e apresentaram resultados melhores daqueles obtidos com o PCR-AG, técnica em que as sensibilidades variam de 42% a 47%. Em relação aos pacientes com infecção por HIV ou sem infecção as sensibilidades do PCR dot-blot variaram de 72% a 75% e apresentaram uma tendência a serem mais altas que as obtidas com PCR-AG de 42% a 43%, como mostra a tabela 3 do artigo 1.

Em relação aos pacientes com suspeita de Tuberculose Pulmonar e com microscopia direta pela coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) negativos infectados ou não por HIV, a sensibilidade do PCR (PCR dot-blot) variou de 61% a 68%, sendo estes dados comparáveis aos dados relatados em recente meta-análise

descrita por Sarmiento (32% to 92%), e também comparável a estudos realizados em países em desenvolvimento usando técnicas de PCR *in house* (40% a 64%), e usando metodologias automatizadas (52% a 76%)(Kwiatkowska et al., 1999; Araj et al., 2000; Su et al., 2000; Kambashi et al., 2001; Sarmiento et al., 2003; Ribeiro et al., 2004; Fegou et al., 2005).

Por outro lado, em relação aos pacientes com suspeita de TB pulmonar e ZN negativos, avaliados especificamente no artigo 3, estudo cujo enfoque foi clínico, na avaliação da técnica de PCR dot-blot foi determinada uma moderada sensibilidade (SE) de (65%) e especificidade (SP) de (83%). A sensibilidade descrita foi similar ao descrito pela literatura para técnicas de PCR, que apresentam variações de sensibilidade de 61% a 83% e variações de especificidade de 84% a 92% para pacientes com TB pulmonar e ZN negativos (Sarmiento et al., 2003; Laifer et al., 2004; Mbulo et al., 2004). Entretanto, as especificidades foram mais baixas do que as descritas para países industrializados (>95) (Goessens et al., 2005).

No artigo 1, a tabela 2 mostra que a sensibilidade do PCR dot-blot foi mais alta entre os pacientes não tratados previamente em comparação com aqueles tratados previamente, sendo estes resultados estatisticamente significativos. Resultados semelhantes foram obtidos com as técnicas de microscopia direta por ZN e de Cultura, sugerindo que no grupo não tratado previamente, tem-se uma concentração de micobactéria mais alta nas amostras clínicas, o que pode ser crucial para a melhora no desempenho das técnicas. O status de HIV não foi significante na avaliação das sensibilidades. Estas

sensibilidades foram comparadas a estudos realizados em países em desenvolvimento, com variações de sensibilidade de (40% a 64%) para técnicas de PCR *in house* e comparável as variações de sensibilidade encontradas nos estudos de avaliação de desempenho utilizando testes moleculares automatizados (52% to 76%) (Kwiatkowska et al., 1999; Araj et al., 2000; Su et al., 2000; Kambashi et al., 2001; Sarmiento et al., 2003; Ribeiro et al., 2004; Fegou et al., 2005).

As especificidades das técnicas de PCR *in house* variaram de 76% para o PCR-AG a 87% para PCR dot-blot, e como descrito anteriormente, foram similares ao descrito anteriormente na literatura (77% to 92%) e mais baixa do que descrito para os métodos automatizados (> 95%) (Chin et al., 1995; Dalovisio et al., 1996; Almeda et al., 2000; Al Zahrani et al., 2001; Goessens et al., 2005). No presente estudo, através da análise da curva ROC (Receiver operator characteristic) das técnicas, que permite avaliar a acurácia global de um teste, e a acurácia nesta situação é descrita como a área da curva ROC. Nesta avaliação, a PCR dot-blot mostrou performance similar a cultura em todos os pacientes com suspeita de Tuberculose Pulmonar analisados, infectados ou não por HIV. Mesmo a cultura apresentando melhor desempenho na avaliação realizada no artigo 1, este estudo mostrou que a PCR *in house* pode oferecer um melhoramento na exclusão de Tuberculose Pulmonar em pacientes com suspeita de Tuberculose Pulmonar, não previamente tratados e atendidos em hospitais. Entre as técnicas de *in house* PCR, a PCR dot-blot parece ser mais apropriada à rotina, uma vez que este método oferece maior acurácia,

provavelmente, em razão da utilização de uma etapa de hibridização, que pode acarretar no aumento da sensibilidade da detecção. Além disso, oferece maior rapidez, facilidade de uso, biossegurança e é custo-efetivo, como foi amplamente discutido no artigo 4 (Tansuphasiri et al., 2002).

5.4 Dificuldades no diagnóstico de TB pulmonar em pacientes infectados por HIV

Como foi amplamente discutido no artigo 1, se observou uma menor sensibilidade na microscopia direta (baciloscopia) em pacientes infectados por HIV (43%) na análise do escarro espontâneo, em acordo com o previamente descrito pela literatura (van Cleeff et al., 2005). Como mencionado por Van Cleef *et. al.* (2003) e Kivihya-Ndugga *et.al.*(2004), neste estudo a sensibilidade da baciloscopia direta foi significativamente mais baixa entre pacientes com a co-infecção HIV/TB, mas a sensibilidade de ambos PCR *in house* utilizados neste estudo não foram influenciadas pelo status do HIV, demonstrando que as técnicas moleculares podem representar uma possibilidade no diagnóstico de TB Pulmonar em pacientes infectados pelo HIV. (Kivihya-Ndugga et al., 2004; van Cleeff et al., 2005).

5.5 Análise da Suspeita Clínica do Médico (probabilidades pré-teste) de diagnóstico de Tuberculose Pulmonar

Alguns estudos têm mostrado que a probabilidade pré-teste estimada pelos médicos ao analisar o paciente, pode influenciar no desempenho das

técnicas moleculares (Lim et al., 2000; Cafrune et al., 2006). A fim de avaliar esta hipótese, no artigo 3, esta questão foi amplamente discutida e analisada com relação ao desempenho das técnicas convencionais e técnicas moleculares *in house*, levando em consideração a probabilidade pré-teste estimada pelos pneumologistas no momento da primeira consulta. Os pacientes com sintomas e sinais consistentes com Tuberculose Pulmonar, com dados clínicos completos e que apresentaram microscopia direta (baciloscopia) ZN negativa, foram estratificados em relação a categorias de risco (Alta, Intermediária e Baixa) de Probabilidade Pré-testes (PP). A prevalência de Tuberculose Pulmonar Ativa nas relativas categorias foi de 67,4% (31/46); 24% (6/25) e 7,5% (6/80), respectivamente ($p < 0,05$), em acordo com descrito pela literatura (Catanzaro et al., 2000). Nestes grupos a proporção de pacientes com Raio-X sugestivo de Tuberculose Pulmonar foi de 0% para a baixa, 24% para a intermediária e 78% para a alta ($p < 0,001$), demonstrando que técnicas de diagnóstico mais sensíveis podem ser fundamentais para o diagnóstico de pacientes com baixa e intermediária suspeita clínica

5.6 O Impacto da Associação das técnicas de PCR *in house* com a técnica de microscopia direta (baciloscopia) para o diagnóstico de TB pulmonar

Os testes em paralelo, geralmente, são solicitados quando o clínico necessita de um diagnóstico rápido, com a finalidade de aumentar a sensibilidade da detecção da doença.

No artigo 2, foi usada esta estratégia de diagnóstico sugerindo que para uma maior eficiência das técnicas *in house*, estas devam ser utilizadas em conjunto com os testes bacteriológicos para o diagnóstico de TB pulmonar.

Em todos os pacientes a associação de técnicas trouxe um ganho na acurácia das técnicas convencionais e das moleculares , mas principalmente para os pacientes não infectados por HIV, e não tratados previamente para TB pulmonar.

O desempenho da microscopia direta associada à cultura foi melhor para os pacientes não previamente tratados para TB pulmonar, como pode ser observado na tabela 1, do artigo 2. A sensibilidade apresentada neste grupo foi de 94% e a especificidade de 99% , com likelihood ratio (LR) positiva de 94,4 e LR negativa de 0,06. Também para os pacientes HIV soronegativos, foi observado um razoável desempenho, com sensibilidade de 95% e especificidade de 99% , com likelihood ratio (LR) positiva de 47,8 e LR negativa de 0,05, como pode ser observado na tabela 2.

Por outro lado o desempenho da microscopia direta associada a PCR dot-blot foi similar aos resultados obtidos para a associação da microscopia direta associada a PCR dot-blot. Em pacientes não previamente tratados para TB pulmonar, como pode ser observado na tabela 1 do artigo 2. A sensibilidade apresentada neste grupo foi de 90% e a especificidade de 86% , com likelihood

ratio (LR) positiva de 6,52 e LR negativa de 0,11. Também para os pacientes HIV soronegativos, tivemos um razoável desempenho, com sensibilidade de 92% e especificidade de 84% , com likelihood ratio (LR) positiva de 5,8 e LR negativa de 0,10, como pode ser observado na tabela 2.

Entretanto quando estratificamos a análise e selecionamos os pacientes não tratados previamente para TB pulmonar e HIV soronegativos, a sensibilidade da microscopia associada a PCR dot-blot chega a 93% e o LR negativo chega a 0,08.

Sendo assim, o artigo 2 confirmou e demonstrou que o PCR *in house* (PCR dot-blot) em combinação com ZN é bastante confiável para o diagnóstico rápido e acurado da TB pulmonar, entre pacientes atendidos em hospitais em países em desenvolvimento. Além disto, os métodos de PCR *in house* são menos caros do que os métodos automatizados e podem ser introduzidos na rotina desde que sejam realizados estudos de custo-efetividade, levando em consideração as características clínicas e radiológicas dos pacientes, a fim de melhor estimar as probabilidades de TB em nosso meio.

Embora a rotina de diagnóstico de TB pulmonar utilize três espécimes para identificar TB pulmonar (ATS, 2000), nesta tese foi avaliada uma única amostra de escarro espontâneo, o que pode ser uma alternativa de diagnóstico quando em associação com a baciloscopia direta em hospitais onde às vezes é difícil obter múltiplas espécimes respiratórias dos pacientes. Nossos dados indicam que a estratégia de combinar as técnicas de diagnóstico pode aumentar a qualidade do diagnóstico e reduzir o tempo de identificação das infecções

causadas pelas micobactérias. A combinação de testes bacteriológicos e de testes moleculares apresenta um grande incremento da sensibilidade e baixa razão de verossimilhança (likelihood ratio) para o diagnóstico de TB pulmonar, principalmente na associação de ZN com PCR dot-blot.

5.7 O Impacto das diferentes taxas de prevalência de Tuberculose Pulmonar no desempenho da técnica de PCR *in house* (PCR dot-blot) utilizada em associação com a técnica de microscopia direta (baciloscopia) para o diagnóstico de TB pulmonar

Diferentes taxas de prevalência, também podem afetar o desempenho de testes laboratoriais, baseado neste fato foram simuladas e discutidas diferentes taxas de prevalência no artigo 2 para TB pulmonar. Estes dados demonstraram que o uso da microscopia direta por ZN em paralelo com o PCR dot-blot alcançou similares valores preditivos positivos e negativos àqueles observados a microscopia direta por ZN utilizada em paralelo com a cultura, entre HIV soropositivos e HIV soronegativos, como mostra a tabela 4 do artigo 2.

A microscopia direta por ZN associado à cultura apresentou o melhor desempenho. Em regiões com prevalências de TB variando de 5 a 10%, usualmente, em unidades de atendimento ambulatoriais com pacientes que apresentam tosse por mais de três semanas, ou seja, pacientes considerados sintomáticos respiratórios de acordo com a OMS, o VPN para a técnica de ZN associada ao PCR dot-blot, variou de 99 a 100%. Em unidades de saúde, onde

as taxas de prevalência variam de 15% a 20%, usualmente hospitais gerais ou centros de referência ambulatoriais, o VPN desta estratégia variou de 98 a 99%. Em hospitais de referência de TB, onde a prevalência de TB varia de 30% a 50%, entre HIV soronegativos, o VPN de ZN em paralelo com PCR dot-blot foi de 96 a 94%, mas entre HIV soropositivos este parâmetro foi reduzido de 93 e 89%.

5.8 Dificuldades no diagnóstico de TB pulmonar em pacientes com baciloscopia negativa (ZN negativo)

A acurácia das técnicas moleculares *in house*, tem sido avaliadas em poucos estudos, a maioria dos estudos de avaliação dos desempenhos das técnicas são realizados em amostras ZN positivas, em países em desenvolvimento (Perkins and Kritski, 2002). Como mostra a Tabela 2, do artigo 3, quando estratificado pela baciloscopia negativa as sensibilidades de todas as técnicas (convencionais e moleculares) foram menores, entretanto a sensibilidade do PCR dot-blot e a alta suspeita clínica, quando esta é utilizada como um teste diagnóstico, foram similares à sensibilidade encontrada para cultura. Estes dados estão de acordo com dados descritos em recente meta-análise que apresenta sensibilidades para ZN negativos que variam de 32% a 92%, usando as técnicas de PCR e são similares a estudos que utilizam técnicas de PCR *in house* (Araj et al., 2000; Kambashi et al., 2001; Sarmiento et al., 2003). Nossos dados demonstram que a técnica de PCR dot-blot, com valor preditivo negativo (VPN) de 86 foi similar ao VPN da Cultura 89 ($p=0,067$)

podendo, desta forma, oferecer um acréscimo no diagnóstico de exclusão de TB pulmonar e no manejo clínico de pacientes ZN negativos, não tratados previamente e atendidos em hospitais em regiões de considerável prevalência de TB e HIV.

5.9 O Impacto da suspeita Clínica do médico na avaliação do desempenho das técnicas de PCR *in house* no diagnóstico de TB pulmonar

Como apresentado no artigo 3, a PCR dot-blot parece oferecer um ganho no valor preditivo negativo (VPN), e na razão de verossimilhança (RV), em pacientes com baixa e alta suspeita clínica (probabilidade pré-teste). A utilidade de testes de PCR para pacientes com alta e baixa suspeita clínica também foi demonstrada em outros estudos (Catanzaro et al., 2000; Lim et al., 2000; Lim et al., 2003). Como mostra a tabela 2 do artigo 3, em pacientes com ZN negativos com suspeita de TB pulmonar, quando se associa a alta suspeita clínica com a técnica de PCR dot-blot, a sensibilidade chega a 91% e o VPN a 90% em pacientes não previamente tratados para TB pulmonar, similar ao descrito utilizando a análise de um método molecular comercial em 214 pacientes (Piersimoni et al., 2005). Considerando o status de HIV e comparando a sensibilidade e o VPN da PCR com a alta suspeita clínica de diagnóstico entre aqueles indivíduos não previamente tratados e aqueles que foram tratados no passado, os resultados foram respectivamente: 91%, 90%, and 89%, 88% para

o grupo de pacientes HIV soropositivos e 93%, 92% e 83%, 80% para o grupo de pacientes HIV soronegativos.

No artigo 3, quando utilizamos a PCR dot-blot em paralelo com a alta probabilidade pré-teste (ou seja, a alta suspeita clínica de diagnóstico de TB pulmonar) o diagnóstico parece oferecer um mais alto VPN em pacientes com baciloscopia negativa com suspeita de TB pulmonar, que não foram previamente tratados e que são HIV soronegativos, como descrito por outros estudos (Catanzaro et al., 2000; Lim et al., 2000; Lim, Mukhopadhyay et al., 2003).

Os pacientes não previamente tratados e HIV soronegativos apresentaram altos valores de sensibilidade (93%) e de VPN (92%), sendo estes dados similares àqueles descritos por Piersimoni *et al*, usando técnicas automatizadas em 214 pacientes suspeitos de TB pulmonar (Piersimoni et al., 2005).

5.10 Falsos positivos e negativos nas técnicas de PCR *in house*

A baixa sensibilidade de ambas as técnicas de PCR *in house*, descritas em todos os artigos desta tese, pode ser devido à presença em parte de inibidores da PCR que permanecem no espécime depois do processo de extração e/ou devido a um pequeno número de micobactérias não distribuídas homogeneamente na amostra a ser testada ou abaixo do limite de detecção do teste de PCR 50 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (Sperhacke et al.,

2004). Como pode ser evidenciado na tabela 2 do artigo1, entre os 73 falsos negativos da metodologia de PCR-AG e entre os 33 falsos negativos da metodologia de PCR dot-blot de todo o grupo analisado, 20/73 (27%) e 3/33 (9%), respectivamente estavam abaixo do limite de detecção do PCR *in house*. A proporção de inibidores foi de 1,9% para o PCR *in house*. Estes dados foram similares aos relatados por outros estudos usando PCR *in house* (0,85% até 5%) (Ieven and Goossens, 1997; Almeda et al., 2000; Piersimoni et al., 2002; Goessens et al., 2005; Tarhan et al., 2005). O uso do elemento de inserção IS6110 como alvo para a PCR é também um colaborador para a diminuição da sensibilidade, pois as cepas de MTB sem o elemento de inserção têm sido relatadas. Todavia, estudos de DNA *fingerprinting* feitos no Brasil e especialmente no RS, não detectaram a presença destas cepas. Além disso, a grande maioria das cepas apresenta um alto número de cópias de IS6110 (Suffys et al., 2000; Cafrune et al., 2006).

A baixa especificidade da PCR, descrita nos artigos 1, 2 e 3, pode ser devido ao contato dos pacientes estudados com indivíduos sintomáticos respiratórios. De fato, 18/22 dos falsos positivos para a metodologia de PCR dot-blot (82%) relataram contato prévio com tuberculosos. Além disso, alguns pacientes apresentaram prévia infecção, portanto é de se esperar que DNA possa ser detectado nas suas amostras respiratórias. A diminuição da especificidade foi similar ao citado pela literatura usando PCR *in house*. (Dilworth et al., 1996; Cohen et al., 1998).

Resultados falso-positivos, por outro lado, também podem ser gerados na fase pré-analítica, isto é, antes da preparação da amostra. O risco pode ser reduzido no momento da coleta da amostra, com a utilização de sistemas fechados (Monovette™, Vacutainer™, para coleta de sangue). Uma vez que para amostras de urina, biópsias, etc, este tipo de coleta é difícil, o laboratório deverá requisitar amostras separadas somente para a análise por PCR e rejeitar amostras inadvertidamente abertas em outro local (Valentine-Thon, 2002).

Resultados falso-negativos podem estar relacionados às variações nas seqüências dos *primers*, às pequenas quantidades de amostra clínica para o isolamento do DNA, e mais freqüentemente, à presença de substâncias que inibem a DNA polimerase, como heparina, hemoglobina, etanol, fenol, SDS, EDTA e acetato de sódio (Valentine-Thon, 2002). A presença de heparina e hemoglobina em diferentes amostras clínicas, em sua maioria respiratórias trouxeram enormes problemas na análise de resultados falso-negativos. Mecanismos de prevenção e detecção de inibição têm sido implementados nos últimos anos, entre eles, pode-se citar a utilização de controles positivo e interno durante o processamento da amostra clínica (Niesters, 2002; Stocher et al., 2002). Alguns estudos propõem a utilização de controles internos adicionados juntamente com as amostras clínicas, antes da extração, permanecendo presente durante todo o procedimento. Este recurso, além de identificar inibidores, possibilita monitorar a eficácia do método da preparação da amostra (Eisenach et al., 1991; Andersen et al., 1993; deWit et al., 1993; Nolte et al., 1993; Kolk et al., 1994; Rosenstraus et al., 1998; Noordhoek et al., 2004). Há

alguns anos foi disponibilizado no mercado um sistema de PCR em tempo real, no qual o risco de contaminação cruzada advinda de produtos amplificados é eliminado, entretanto estudos de custo-efetividade deste tipo de metodologia devem ser realizados (Torres et al., 2000; Miller et al., 2002; Niesters, 2002; Cleary et al., 2003)

5.11 Análise de custo-efetividade das técnicas de PCR *in house*

No artigo 4, analisamos o custo-efetividade das técnicas de PCR *in house*. Com a finalidade de executar esta análise, primeiramente, foram levantados os custos relativos aos serviços de saúde e os custos relativos aos gastos dos pacientes, descritos amplamente no artigo 4.

Um modelo de decisão analítico foi desenvolvido usando o software Excel 7.0 com a colaboração de Paul Klatzer, de The Netherlands do Royal Tropical Institute (KIT), KIT Biomedical Research, que nos enviou um modelo para análise em planilha de EXCEL, com base na literatura (Petitti, 2000). Este modelo foi utilizado para comparar a rotina de procedimentos de diagnóstico de TB pulmonar usando o método de microscopia direta por coloração com ZN em escarros espontâneos com uma combinação de procedimentos usando a microscopia direta por coloração ZN associado à Cultura, a microscopia direta por coloração ZN associado ao PCR-AG e a microscopia direta por coloração ZN associado ao PCR dot-blot. Os custos de cada estratégia foram obtidos a partir da referência do Sistema Único de Saúde (SUS). Os valores de custo-

efetividade foram expressos como: a) custo por caso de TB pulmonar diagnosticado corretamente; b) custo por caso de TB pulmonar corretamente diagnosticado e tratado, incluindo tratamento de casos incorretamente diagnosticados; c) custo por caso de TB pulmonar incorretamente diagnosticado e não tratado. Uma análise de sensibilidade, também, foi realizada para avaliar se fatores ambientais ou laboratoriais poderiam afetar os valores de custo-efetividade.

Neste estudo, foi encontrado menor índice de custo-efetividade usando o a microscopia direta por coloração ZN em associação com o PCR, por caso corretamente diagnosticado, quando comparado com o descrito em outros modelos utilizando técnicas de PCR automatizadas [Amplicor MTB PCR e amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct test (MTD-Gen-Probe)], provavelmente, devido à menor acurácia observada em técnicas de PCR *in house* (Roos et al., 1998; van Cleeff et al., 2005).

Como pode ser evidenciado e calculado através dos dados da tabela 4 do artigo 4, a razão que representa o custo-efetividade por caso de TB pulmonar corretamente diagnosticado para a estratégia de microscopia direta por coloração ZN associada ao PCR *dot-blot* foi mais alta do que a razão de custo-efetividade da estratégia microscopia direta por coloração ZN associada à Cultura (razão de 0,78). O custo da estratégia da microscopia direta por coloração ZN associado ao PCR *dot-blot* foi 1,3 vezes inferior ao custo da estratégia da ZN associada à Cultura., similar ao descrito previamente para técnicas de PCR automatizadas (razão de 1,8). Quando consideramos somente

os custos dos pacientes, a estratégia de microscopia direta por coloração ZN associada ao PCR *dot-blot* foi mais custo-efetiva do que a estratégia de ZN associada à cultura com razão de 0,7.

Como se evidencia na tabela 5, do artigo 4, o custo-efetividade por caso corretamente diagnosticado e tratado, incluindo o tratamento dos casos falsamente diagnosticados na estratégia de microscopia direta por coloração ZN associado ao PCR *dot-blot* foi mais alto do que a estratégia de ZN associada à Cultura (ratio of 0,7).

Como mostra a tabela 6 do artigo 4, a análise de sensibilidade comparando o custo-efetividade da estratégia de ZN associada à Cultura e ZN associada ao PCR *dot-blot*, ajustando diferentes taxas de prevalência, mostrou que a razão de custo-efetividade foi muito similar na maioria dos ajustes. Alguns ganhos no custo-efetividade, entretanto, podem ser obtidos quando a sensibilidade e a especificidade do PCR são ajustadas para 95%, corroborando com dados descritos previamente em que uma sensibilidade maior do que 80% pode ser um fator importante para aumentar o custo-efetividade de métodos de PCR (Roos et al., 1998).

A análise de custo-efetividade permitiu concluir que a estratégia de associar microscopia direta por coloração de ZN ao PCR *dot-blot* usando escarro espontâneo pode ser uma alternativa custo-efetiva, especialmente em hospitais de países em desenvolvimento com alta prevalência de TB e HIV. ZN associado ao PCR *dot-blot* mostrou um melhoramento na sensibilidade, valores preditivos negativos e oferecem um ganho para a exclusão de casos de TB

pulmonar em pacientes suspeitos. Todavia, estudos interlaboratoriais e estudos de custo-efetividade em outros ambientes devem ser realizados para avaliar o desempenho do PCR *dot-blot* em outras condições, antes deste ser introduzido efetivamente na rotina clínica.

5.12 Recomendações para a utilização de testes moleculares em rotina

A utilidade clínica dos testes de AAN tem sido discutida e para os testes comerciais aprovados, o FDA recomenda que sejam coletadas 3 amostras em dias diferentes para a baciloscopia e cultura. Os testes devem ser realizados na primeira amostra com baciloscopia positiva (Woods, 2001).

Por outro lado, se o resultado for baciloscopia positivo, mas AAN negativo, um teste para verificar a presença de inibidores deve ser realizado.

Se não ocorrer detecção de inibidores e se o espécime clínico adicional analisado permanecer negativo pelos testes de AAN, presume-se que o paciente esteja contaminado com uma micobactéria que não cause tuberculose. Mas, se inibidores forem detectados, o teste de AAN não oferece nenhuma ajuda no diagnóstico. Se o espécime clínico tiver resultado de baciloscopia negativa, mas AAN positivo, e o mesmo resultado for obtido com uma amostra adicional, o paciente, presumivelmente, tem TB. No caso de todas as amostras de escarro permanecerem negativas na baciloscopia e na AAN, pode-se afirmar apenas

que na amostra analisada, não foram detectados bacilos ou DNA de *M.tuberculosis*, porém isto não exclui a possibilidade da TB ativa e o julgamento clínico deverá prevalecer no prosseguimento da investigação diagnóstica ou início de tratamento de prova (Soini and Musser, 2001).

Quando a suspeita é de TB extrapulmonar, o diagnóstico clínico é bem mais complicado e o isolamento do agente infeccioso é um desafio. Nestes casos, os testes de AAN podem ser de grande auxílio para o clínico. Entretanto, é importante afirmar que os testes comerciais só estão aprovados para amostras respiratórias. Porém, tanto os testes comerciais e os padronizados em laboratório (PCR *in house*) têm sido avaliados em estudos com diferentes amostras extrapulmonares. Em geral, o desempenho dos testes de AAN é bastante similar ao obtido com as amostras pulmonares (Portillo-Gomez et al., 2000).

Os testes de AAN podem, sem dúvida, contribuir para um diagnóstico mais efetivo e em menor tempo. No entanto, principalmente em países de elevada prevalência de TB, de TB associada ao HIV, de micobacterias atípicas, a interpretação dos resultados deve ser realizada com cautela, sem substituir a baciloscopia e a cultura (importante para a identificação da espécie e teste de sensibilidade). Ainda não se têm informações suficientes sobre o desempenho dos testes de AAN realizados com amostras provenientes de pacientes já tratados de TB no passado, pois os resultados de AAN, freqüentemente, permanecem positivos após o tratamento (Soini and Musser, 2001). Portanto, em regiões de elevada prevalência de TB e HIV, como em grandes cidades do

Brasil, estudos de eficácia e de efetividade de testes de AAN que possam ser aplicáveis à rotina clínica são de enorme importância.

6 Conclusões

- Os estudos realizados mostraram que a PCR *in house* pode oferecer um ganho para a exclusão de TB pulmonar em pacientes com suspeita de TB pulmonar não tratados previamente e avaliados em hospitais;
- Entre as técnicas de PCR *in house* PCR, a PCR *dot-blot* parece ser a mais apropriada à rotina, porque este método ofereceu uma maior acurácia, rapidez, facilidade de uso, maior segurança, e grande objetividade na interpretação dos resultados.
- PCR *dot-blot* usado em paralelo com a alta suspeita clínica de diagnóstico de TB pulmonar pode contribuir para o diagnóstico de pacientes com suspeita de TB pulmonar, com baciloscopia negativa, principalmente em pacientes não tratados previamente e atendidos em hospitais de referência para TB.
- PCR *dot-blot* usado em paralelo com a baciloscopia direta por ZN mostrou um melhoramento na sensibilidade, likelihood ratio (LR) negativas e valores preditivos negativos. Esta estratégia também pode oferecer ganhos na exclusão de TB pulmonar, especialmente em pacientes HIV negativos, não previamente tratados em hospitais de países em desenvolvimento
- A estratégia da PCR *dot-blot* usada em paralelo com a baciloscopia direta, usada em escarro espontâneo pode ser uma alternativa, custo-

efetiva, especialmente em hospitais de países em desenvolvimento com alta prevalência de TB e HIV.

- Estudos interlaboratoriais e de custo-efetividade em outros cenários devem ser realizados para avaliar o desempenho da PCR dot-blot em outras condições, antes desta ser efetivamente introduzida na rotina.

7 Perspectivas

O PCR *dot-blot* parece ser promissor no diagnóstico de TB pulmonar, principalmente, quando associado à suspeita clínica do médico e quando associado à microscopia direta por cloração de ZN, notadamente em pacientes não previamente tratados e HIV negativos.

Entretanto a fim de efetivamente ser colocado no fluxograma de triagem diagnóstico para TB, alguns estudos ainda são necessários, como:

- Estudos multicêntricos de validação interlaboratorial em parceria com pesquisadores da Rede-TB, de São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro, a fim de verificar a reprodutibilidade da metodologia quando realizada por outros pesquisadores, levando em consideração as diversas variáveis laboratoriais.
- Avaliação da acurácia do PCR *dot-blot* no diagnóstico de formas de TB extrapulmonar avaliando amostras não respiratórias, como líquido, biópsias, líquido pleural e sangue.
- Avaliação da acurácia do PCR *dot-blot* usado em associação com a microscopia direta por ZN no diagnóstico de formas de TB extrapulmonar avaliando amostras não respiratórias, como líquido, biópsias, líquido pleural e sangue.
- Estudos de custo-efetividade do PCR *dot-blot* associado à microscopia direta por coloração de ZN para o diagnóstico de TB extra-pulmonar

- Estudos multicêntricos de custo-efetividade do PCR *dot-blot* em colaboração com outras regiões do país e com outros países, a fim de verificar a efetividade em diferentes taxas de prevalência de TB e HIV

8 Referências

- Al Zahrani, K., H. Al Jahdali, et al. (2001). "Yield of smear, culture and amplification tests from repeated sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **5**(9): 855-60.
- Almeda, J., A. Garcia, et al. (2000). "Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **19**(11): 859-67.
- Andersen, A. B., S. Thybo, et al. (1993). "Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **12**(12): 922-7.
- Araj, G. F., R. S. Talhouk, et al. (2000). "Comparative performance of PCR-based assay versus microscopy and culture for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical respiratory specimens in Lebanon." Int J Tuberc Lung Dis **4**(9): 877-81.
- ATS (2000). "Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999." Am J Respir Crit Care Med **161**(4 Pt 1): 1376-95.
- Bates, J. H. (1980). "Transmission and pathogenesis of tuberculosis." Clin Chest Med **1**(2): 167-74.

- Behr, M. A., S. A. Warren, et al. (1999). "Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli." Lancet **353**(9151): 444-9.
- Bloom, B. R. and C. J. Murray (1992). "Tuberculosis: commentary on a reemergent killer." Science **257**(5073): 1055-64.
- Brasil, M. d. S. d. (2005). "DATASUS-Indicadores e Dados Básicos do Brasil-2005- IDB2005." Plano de Controle da Tuberculose no Brasil no período de 2001-2005.
- Cafrune, P. I., L. W. Riley, et al. (2006). "Recent transmission of tuberculosis involving retired patients." J Infect.
- Camus, J. C., M. J. Pryor, et al. (2002). "Re-annotation of the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv." Microbiology **148**(Pt 10): 2967-73.
- Catanzaro, A., S. Perry, et al. (2000). "The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial." Jama **283**(5): 639-45.
- Chin, D. P., D. M. Yajko, et al. (1995). "Clinical utility of a commercial test based on the polymerase chain reaction for detecting Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens." Am J Respir Crit Care Med **151**(6): 1872-7.
- Cleary, T. J., G. Roudel, et al. (2003). "Rapid and specific detection of Mycobacterium tuberculosis by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorogenic probe." J Clin Microbiol **41**(10): 4783-6.

- Cohen, R. A., S. Muzaffar, et al. (1998). "Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum collected within 24 hours of hospital admission." Am J Respir Crit Care Med **157**(1): 156-61.
- Cole, S. T. and B. G. Barrell (1998). "Analysis of the genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv." Novartis Found Symp **217**: 160-72; discussion 172-7.
- Conde, M. B., C. M. Figueira, et al. (1999). "Predictive value of the acid fast smear for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens in a reference center of HIV/AIDS in Rio de Janeiro, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **94**(6): 787-90.
- Dalcomo, M. P., A. Fortes, F.F Melo, R. Motta, J. I. Netto, N. Cardoso, M. Andrade, A. W. Barreto, E.G. Gerhardt (1999). "Estudo da efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil." Jornal de Pneumologia **25**: 70-77.
- Dalovisio, J. R., S. Montenegro-James, et al. (1996). "Comparison of the amplified Mycobacterium tuberculosis (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR, and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens." Clin Infect Dis **23**(5): 1099-106; discussion 1107-8.
- deWit, D., M. Wootton, et al. (1993). "Simple method for production of internal control DNA for Mycobacterium tuberculosis polymerase chain reaction assays." J Clin Microbiol **31**(8): 2204-7.

- Dilworth, J. P., M. Goyal, et al. (1996). "Comparison of polymerase chain reaction for IS6110 and Amplicor in the diagnosis of tuberculosis." Thorax **51**(3): 320-2.
- Drobniewski, F. A., M. Caws, et al. (2003). "Modern laboratory diagnosis of tuberculosis." Lancet Infect Dis **3**(3): 141-7.
- Dye, C., C. J. Watt, et al. (2002). "Low access to a highly effective therapy: a challenge for international tuberculosis control." Bull World Health Organ **80**(6): 437-44.
- Dye, C. and B. G. Williams (2000). "Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8180-5.
- Dziadek, J., A. Sajduda, et al. (2001). "Specificity of insertion sequence-based PCR assays for mycobacterium tuberculosis complex." Int J Tuberc Lung Dis **5**(6): 569-74.
- Equipe de Controle Epidemiológico/Coordenadoria de Vigilância em Saúde/Secretaria Municipal de Porto Alegre 2005. "Análise comparativa do ingresso de casos novos de Tuberculose ocorrido na rede ambulatorial e hospitalar de Porto Alegre nos anos de 2003 e 2004." Boletim Epidemiológico **27**(Ano VIII).
- Edwards, C. K., 3rd, H. B. Hedegaard, et al. (1986). "Chronic infection due to Mycobacterium intracellulare in mice: association with macrophage release of prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon-gamma." J Immunol **136**(5): 1820-7.

- Eisenach, K. D., M. D. Cave, et al. (1990). "Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*." J Infect Dis **161**(5): 977-81.
- Eisenach, K. D., M. D. Sifford, et al. (1991). "Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction." Am Rev Respir Dis **144**(5): 1160-3.
- Ellingson, J. L., J. R. Stabel, et al. (2000). "Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies." Mol Cell Probes **14**(3): 153-61.
- Fegou, E., E. Jelastopulu, et al. (2005). "Sensitivity of the Cobas Amplicor system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and extrapulmonary specimens." Clin Microbiol Infect **11**(7): 593-6.
- Folgueira, L., R. Delgado, et al. (1993). "Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction." J Clin Microbiol **31**(4): 1019-21.
- Forbes, B. A. and K. E. Hicks (1993). "Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction." J Clin Microbiol **31**(7): 1688-94.
- Gamboa, F., G. Fernandez, et al. (1998). "Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens." J Clin Microbiol **36**(3): 684-9.

- Gamboa, F., J. M. Manterola, et al. (1997). "Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in nonrespiratory specimens by Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test." J Clin Microbiol **35**(1): 307-10.
- Goessens, W. H., P. de Man, et al. (2005). "Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens." J Clin Microbiol **43**(6): 2563-6.
- Haas, D. W. and R. M. Des Prez (1994). "Tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome: a historical perspective on recent developments." Am J Med **96**(5): 439-50.
- Hargreaves, N. J., O. Kadzokumanja, et al. (2001). "'Smear-negative' pulmonary tuberculosis in a DOTS programme: poor outcomes in an area of high HIV seroprevalence." Int J Tuberc Lung Dis **5**(9): 847-54.
- Ieven, M. and H. Goossens (1997). "Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory." Clin Microbiol Rev **10**(2): 242-56.
- Jeffrey, L. F. (2000). "Perspectives on Pathogens at ASM Centennial Symposium." American Society for Microbiology **66**(1): 11-14.
- Kambashi, B., G. Mbulo, et al. (2001). "Utility of nucleic acid amplification techniques for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in sub-Saharan Africa." Int J Tuberc Lung Dis **5**(4): 364-9.

- Keshinro, B. and M. Y. Diul (2006). "HIV-TB: epidemiology, clinical features and diagnosis of smear-negative TB." Trop Doct **36**(2): 68-71.
- Kivihya-Ndugga, L., M. van Cleeff, et al. (2004). "Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus." J Clin Microbiol **42**(3): 1012-5.
- Kolk, A. H., G. T. Noordhoek, et al. (1994). "Mycobacterium smegmatis strain for detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria." J Clin Microbiol **32**(5): 1354-6.
- Kritski, A., Queiroz M. F. C., Barreto C. E. N., Pereira N. M., Bravin Y., Vasconcelos G., Fonseca L. S. (2003). "Fatores de risco associados a tuberculose pulmonar paucibacilar em pacientes atendidos em centros de saúde da cidade do Rio de Janeiro." Pulmão **12**: 10-16.
- Kritski, A. L. (2000). "Tuberculose do Ambulatório a Enfermaria." Atheneu **2 ed.**
- Kritski, A. L., M. J. Marques, et al. (1996). "Transmission of tuberculosis to close contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **153**(1): 331-5.
- Kritski, A. L. and A. Ruffino-Netto (2000). "Health sector reform in Brazil: impact on tuberculosis control." Int J Tuberc Lung Dis **4**(7): 622-6.
- Kudoh, S. and T. Kudoh (1974). "A simple technique for culturing tubercle bacilli." Bull World Health Organ **51**(1): 71-82.

- Kwiatkowska, S., J. Marczak, et al. (1999). "Clinical utility of a commercial ligase chain reaction kit for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **3**(5): 421-5.
- Laifer, G., A. F. Widmer, et al. (2004). "Polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*: impact on clinical management of refugees with pulmonary infiltrates." Chest **125**(3): 981-6.
- Lim, T. K., A. Gough, et al. (2000). "Relationship between estimated pretest probability and accuracy of automated *Mycobacterium tuberculosis* assay in smear-negative pulmonary tuberculosis." Chest **118**(3): 641-7.
- Lim, T. K., A. Mukhopadhyay, et al. (2003). "Role of clinical judgment in the application of a nucleic acid amplification test for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis." Chest **124**(3): 902-8.
- Mbulo, G. M., B. S. Kambashi, et al. (2004). "Comparison of two bacteriophage tests and nucleic acid amplification for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in sub-Saharan Africa." Int J Tuberc Lung Dis **8**(11): 1342-7.
- Melo, F. A. F., J. B. Afiune, et al. (2003). "Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo." Rev. Soc. Bras. Med. Trop. **36**(1).
- Miller, N., T. Cleary, et al. (2002). "Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR." J Clin Microbiol **40**(11): 4143-7.

- Mitarai, S., A. Kurashima, et al. (2001). "Clinical evaluation of Amplicor Mycobacterium detection system for the diagnosis of pulmonary mycobacterial infection using sputum." Tuberculosis (Edinb) **81**(5-6): 319-25.
- Mitarai, S., S. Tanoue, et al. (2001). "Potential use of Amplicor PCR kit in diagnosing pulmonary tuberculosis from gastric aspirate." J Microbiol Methods **47**(3): 339-44.
- Murray, J. (1999). "Manual of Clinical Microbiology." **7 th Edition**.
- Niesters, H. G. (2002). "Clinical virology in real time." J Clin Virol **25 Suppl 3**: S3-12.
- Nolte, F. S., B. Metchock, et al. (1993). "Direct detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization." J Clin Microbiol **31**(7): 1777-82.
- Noordhoek, G. T., A. H. Kolk, et al. (1994). "Sensitivity and specificity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comparison study among seven laboratories." J Clin Microbiol **32**(2): 277-84.
- Noordhoek, G. T., S. Mulder, et al. (2004). "Multicentre quality control study for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by nucleic amplification methods." Clin Microbiol Infect **10**(4): 295-301.
- Noordhoek, G. T., J. D. van Embden, et al. (1996). "Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis: an international collaborative quality control study among 30 laboratories." J Clin Microbiol **34**(10): 2522-5.

- Perkins, M. D. and A. L. Kritski (2002). "Diagnostic testing in the control of tuberculosis." Bull World Health Organ **80**(6): 512-3.
- Petitti D. B.(2000). "Meta-Analysis, Decision Analysis and Cost-Effectiveness Analysis: Methods for quantitative synthesis in Medicine.Oxford University Press. **2 ed**
- Picon, P. D., M. L. D. Giustina, et al. (2002). "Resultado do tratamento da tuberculose com estreptomicina, isoniazida e etambutol (esquema SHM)" Jornal de Pneumologia **28** (4).
- Piersimoni, C., D. Nista, et al. (2005). "Clinical suspicion as a primary guidance to use commercial amplification tests for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis." Diagn Microbiol Infect Dis **53**(3): 195-200.
- Piersimoni, C., C. Scarparo, et al. (2002). "Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from respiratory and extrapulmonary specimens." J Clin Microbiol **40**(11): 4138-42.
- Portillo-Gomez, L., S. L. Morris, et al. (2000). "Rapid and efficient detection of extra-pulmonary Mycobacterium tuberculosis by PCR analysis." Int J Tuberc Lung Dis **4**(4): 361-70.
- Ribeiro, F. K., V. Dettoni Vdo, et al. (2004). "Evaluation of a commercial test based on ligase chain reaction for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens." Rev Soc Bras Med Trop **37**(6): 431-5.

- Roos, B. R., M. R. van Cleeff, et al. (1998). "Cost-effectiveness of the polymerase chain reaction versus smear examination for the diagnosis of tuberculosis in Kenya: a theoretical model." Int J Tuberc Lung Dis **2**(3): 235-41.
- Rosenstraus, M., Z. Wang, et al. (1998). "An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance." J Clin Microbiol **36**(1): 191-7.
- Rossetti L R, J. S. B., Rodrigues V F S, Moura A R, Oliveira H, Zaha A (1997). "Improvement of Mycobacterium tuberculosis detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix." J Microbiol Meth **28**: 139-146.
- Rossetti, M. L., A. R. Valim, et al. (2002). "[Resistant tuberculosis: a molecular review]." Rev Saude Publica **36**(4): 525-32.
- Sarmiento, O. L., K. A. Weigle, et al. (2003). "Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis." J Clin Microbiol **41**(7): 3233-40.
- Scarparo, C., P. Piccoli, et al. (2000). "Comparison of enhanced Mycobacterium tuberculosis amplified direct test with COBAS AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory and extrapulmonary specimens." J Clin Microbiol **38**(4): 1559-62.
- Schijman, A. G., M. H. Losso, et al. (2004). "Prospective evaluation of in-house polymerase chain reaction for diagnosis of mycobacterial diseases in

- patients with HIV infection and lung infiltrates." Int J Tuberc Lung Dis **8**(1): 106-13.
- Sharma, S. K., A. Mohan, et al. (2005). "Miliary tuberculosis: new insights into an old disease." Lancet Infect Dis **5**(7): 415-30.
- Shibuya, Y., T. Shiozaki, et al. (2000). "Efficacy of Amplicor PCR for the diagnosis of tuberculosis in respiratory specimens other than sputum." Tuber Lung Dis **80**(4-5): 209-15.
- Silva, M. S., S. G. Senna, et al. (2003). "Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis." J Clin Microbiol **41**(9): 4471-4.
- Soini, H., S. A. Agha, et al. (1996). "Comparison of amplicor and 32-kilodalton PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens." J Clin Microbiol **34**(7): 1829-30.
- Soini, H. and J. M. Musser (2001). "Molecular diagnosis of mycobacteria." Clin Chem **47**(5): 809-14.
- Sperhacke, R. D., F. C. Mello, et al. (2004). "Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay." Int J Tuberc Lung Dis **8**(3): 312-7.
- Stocher, M., V. Leeb, et al. (2002). "A simple approach to the generation of heterologous competitive internal controls for real-time PCR assays on the LightCycler." J Clin Virol **25 Suppl 3**: S47-53.
- Styblo, K. (1991). "The impact of HIV infection on the global epidemiology of tuberculosis." Bull Int Union Tuberc Lung Dis **66**(1): 27-32.

- Su, W. J., A. P. Tsou, et al. (2000). "Clinical experience in using polymerase chain reaction for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis." Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei) **63**(7): 521-6.
- Suffys, P., J. C. Palomino, et al. (2000). "Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **4**(2): 179-83.
- Suffys, P. N., M. E. Araujo, et al. (1997). "The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing--a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **92**(3): 297-316.
- Suffys, P. N., M. E. Ivens de Araujo, et al. (2000). "Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of Mycobacterium tuberculosis and comparison with an international fingerprint database." Res Microbiol **151**(5): 343-51.
- Tansuphasiri, U., S. Suttirat, et al. (2002). "Comparison of microplate hybridization with gel electrophoresis and dot blot hybridization for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis PCR products." Southeast Asian J Trop Med Public Health **33**(1): 136-46.
- Tarhan, G., M. B. Saygan, et al. (2005). "[Retrospective evaluation of Cobas Amplicor system in the rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis complex]." Mikrobiyol Bul **39**(1): 35-41.
- Tuberculose (2006). "API TB Consensus Guidelines 2006: Management of pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situations." J Assoc Physicians India **54**: 219-34.

- Thierry, D., A. Brisson-Noel, et al. (1990). "Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis." J Clin Microbiol **28**(12): 2668-73.
- Torres, M. J., A. Criado, et al. (2000). "Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in Mycobacterium tuberculosis." J Clin Microbiol **38**(9): 3194-9.
- Tuberculose II Consenso Brasileiro -Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004
Jornal Brasileiro de Pneumologia **30**(1).
- Valentine-Thon, E. (2002). "Quality control in nucleic acid testing--where do we stand?" J Clin Virol **25 Suppl 3**: S13-21.
- van Cleeff, M., L. Kivihya-Ndugga, et al. (2005). "Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya." Int J Tuberc Lung Dis **9**(8): 877-83.
- van Cleeff, M. R., L. Kivihya-Ndugga, et al. (2003). "A comprehensive study of the efficiency of the routine pulmonary tuberculosis diagnostic process in Nairobi." Int J Tuberc Lung Dis **7**(2): 186-9.
- Walker, D., R. McNerney, et al. (2000). "An incremental cost-effectiveness analysis of the first, second and third sputum examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **4**(3): 246-51.
- Wang, S. X. and L. Tay (1999). "Evaluation of three nucleic acid amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens." J Clin Microbiol **37**(6): 1932-4.

- Watterson, S. A. and F. A. Drobniowski (2000). "Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections." J Clin Pathol **53**(10): 727-32.
- Wells, W. (1948). "On the mechanism of droplet-nucleus infection, II: quantitative experimental air-borne tuberculosis in rabbits." AM J Hygiene **47**(11).
- WHO (2005). "Global tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing." WHO Report: 349.
- WHO (2006). "Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing" WHO Report 2006: 362.
- Woods, G. L. (2001). "Molecular techniques in mycobacterial detection." Arch Pathol Lab Med **125**(1): 122-6.
- Yuen, K. Y., W. C. Yam, et al. (1997). "Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis." J Clin Microbiol **35**(6): 1385-9.

9 Anexos

9.1 Anexo 1: Termo de consentimento

Termo de consentimento Livre

Objetivos e Relevância da pesquisa

Objetivos

- Avaliar uma técnica mais sensível para o diagnóstico precoce da tuberculose
- Avaliar o custo-efetividade clínica da técnica de PCR no diagnóstico de Tuberculose Pulmonar em pacientes co-infectados. (Soropositivos- portadores de HIV e Tuberculose)

Relevância da pesquisa

A tuberculose é uma infecção oportunista muito comum em pessoas infectadas com o vírus HIV. A tuberculose pode causar uma doença pulmonar caracterizada por tosse, febre, suores noturnos e perda de peso.

O diagnóstico precoce da tuberculose em pacientes portadores de HIV é importante para o correto tratamento da doença. Atualmente, os métodos de rotina para o diagnóstico da tuberculose em pacientes portadores de HIV são a baciloscopia, que é pouco sensível, e a cultura que normalmente leva de 8 a 12 semanas para a correta identificação e isolamento da micobactéria causadora da tuberculose.

O CDCT (Centro de Desenvolvimento em Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul), o Laboratório da Prefeitura de Porto Alegre, e a Unidade de Pneumologia da Universidade do Rio de Janeiro estão trabalhando juntos para validar uma técnica mais sensível e mais rápida para o diagnóstico de tuberculose em escarro, a PCR (Reação em cadeia da polimerase).

1. Procedimentos

1.1 Coleta de Dados:

Se eu concordar em participar deste estudo, eu responderei a um questionário padronizado que investigará aspectos do meu perfil sócio - econômico, os fatores de risco que estão associados ao adoecimento por tuberculose, o consumo de bebidas alcoólicas e a presença de sintomas.

Exames que serão realizados

Serei submetido a exame médico, a um teste na pele (teste tuberculínico cutâneo - teste de PPD) , a uma radiografia de tórax, e à coleta de material proveniente dos pulmões (escarro espontâneo). Se eu permitir também, serão coletados 5ml de sangue no meu antebraço, na face anterior, com agulha e seringa descartáveis, antecedido por antissepsia local. O sangue será utilizado para realização da PCR.

Utilização dos materiais coletados

O material coletado, seguindo modelo de investigação da tuberculose pulmonar neste Centro de Saúde ou Hospital, será submetido à rotina do laboratório de micobacteriologia, e uma parte deste material também será submetida à um teste de pesquisa chamada PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) na tentativa de melhorar as possibilidades de diagnóstico da tuberculose.

2. Local do Estudo

Os procedimentos de coleta no Laboratório do HSP e os demais exames serão realizados pela equipe médica do HSP.

3. Riscos / Desconfortos

Algumas das questões que constam do questionário podem ser inapropriadas e produzir sentimentos indesejáveis, mas caso eu ache necessário poderei interromper a entrevista a qualquer momento. Os riscos da retirada de sangue incluem introdução da agulha, desconforto temporário, pequena ferida e, raramente a formação de um pequeno hematoma. A realização do teste na pele (teste PPD) pode causar leve desconforto no local de aplicação e as vezes prurido (coceira), de fácil controle e sem posteriores seqüelas. A radiação empregada para a realização de radiografia de tórax não implica em riscos significativos para a saúde. Caso seja necessário realizar a indução de escarro, conforme rotina padronizada, os riscos envolvidos serão de: desconforto causado pela tosse e eventuais náuseas de curta duração. Raramente, em pacientes com hiperreatividade brônquica ocorre chiado no peito (broncoespasmo), usualmente de rápida reversão. Caso seja necessário realizar broncofibroscopia com coleta de lavado broncoalveolar, os riscos envolvidos serão de: desconforto causado pela tosse, febrícula de curta duração e sangramento respiratório de pequena quantidade, com controle geralmente alcançável por medidas locais.

4. Tratamento e compensação por danos.

Se eu tiver algum problema de saúde em decorrência deste estudo, o tratamento será fornecido pela instituição participante. A, a SES, o LACEN/RS e o CDCT/RS não prevêm nenhuma forma de compensação financeira por possíveis injúrias.

5.Desistência da participação no estudo

Se eu decidir não participar neste estudo, ou interromper a minha participação a qualquer momento, o meu tratamento médico será mantido pelo SES-SUS

6.Custos para os participantes

Não haverá custos para mim, caso decida pela minha participação neste estudo, nem para os tratamentos que eu porventura necessitar. Os custos dos exames laboratoriais, radiológicos, dos testes cutâneos e de análise das minhas amostras respiratória e sanguínea serão cobertos pelo estudo.

7.Benefício

Os procedimentos médicos aos quais eu irei me submeter aumentarão as possibilidades de um diagnóstico mais rápido da tuberculose pulmonar seja feito e, desta forma, tratamentos inadequados poderão ser evitados. Com isto, espera-se que mais conhecimentos científicos sejam obtidos com conseqüente melhoria futura do diagnóstico e do tratamento de pessoas que estejam na mesma condição que eu.

8.Reembolso

Eu não serei reembolsado por participar deste estudo.

9.Confidencialidade dos dados

A participação em projetos de pesquisa pode resultar em perda de privacidade, entretanto, procedimentos serão tomados pelos responsáveis por este estudo, no intuito de proteger a confidencialidade das informações que eu forneça. As informações serão codificadas e mantidas num local reservado o tempo todo. Somente a Dra. Luciene Cardoso Scherer e os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso às informações e aos questionários. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos em computador e aqueles serão mantidos arquivados em local reservado e com acesso restrito por senha. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos a que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios, assim como das alternativas às quais poderei ser submetido, todos acima listados. Fui igualmente, informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida do procedimento, risco, benefício e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade do meu cuidado e tratamento;
- da garantia de que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e de que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa;
- do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade em continuar participando;
- da disponibilidade de tratamento médico e indenização, conforme estabelece a legislação, caso existam danos a minha saúde diretamente causados por esta pesquisa;
- de que se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

O Pesquisador envolvido diretamente neste Projeto de Pesquisa é a Dra Luciene Scherer, farmacêutica bioquímica, (33520336), disponível para prestar qualquer esclarecimento, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa Instituição em ____/____/____.

Data ____/____/____

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário:

Nome _____
Assinatura _____

Nome e assinatura do responsável pela obtenção do presente consentimento

Nome _____
Assinatura _____

Observação: O presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do Paciente ou de seu Representante Legal e outra com o Pesquisador Responsável.