

Diagnóstico laboratorial da M.tuberculose: Vantagens e desvantagens presentes nesses métodos e como o método da PCR pode ajudar no diagnóstico da doença.

Laboratory diagnosis of M.tuberculose: Advantages and disadvantages present in these methods and the method of PCR may help in diagnosing the disease.

Resumo

O objetivo deste trabalho é revisar e comentar sobre as vantagens e desvantagens dos métodos tradicionais aplicados na rotina de laboratórios clínicos, e como essa nova técnica de POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) pode ajudar no diagnóstico precoce da tuberculose.

A tuberculose é uma das doenças que mais causa morte no mundo. Seu contágio é muito simples fazendo com que cada vez mais pessoas do mundo inteiro possam ser contaminadas. Devido a esta disseminação rápida muitas pessoas imunocomprometidas, HIV, são acometidas deste mal possibilitando que a doença progrida aceleradamente.

Laboratórios usam métodos tradicionais que ajudam no diagnóstico da doença. Utilizam a baciloscopia, um método simples, de baixo custo que detecta o bacilo de koche, mas não possui uma especificidade e não detecta quantidades menores do bacilo presentes em determinados materiais como meningoencefálica, renal, pleura óssea e ganglionar. Outro método utilizado é a cultura, sendo um método específico ideal para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, pois alia a alta especificidade que falta á radiologia convencional, á sensibilidade que falta á baciloscopia direta, podendo este método aumentar em ate 30% a positividade do exame direto de escarro, mas devido à urgência de um diagnóstico rápido ele se torna demorado, pois pela própria característica de replicação do *M. tuberculosis*,

podendo, ainda, não informar qual membro do complexo *M. tuberculosis* foi o causador da doença, o que pode confundir o diagnóstico e a epidemiologia. Para auxiliar o diagnóstico da tuberculose, o método de POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) foi desenvolvido auxiliando no tratamento da doença e ajudando a diagnosticar com mais rapidez.

Palavra- chave: Tuberculose, baciloscopia, cultura, método de PCR.

-

ABSTRACT

The objective of this paper is to review and comment on the advantages and disadvantages of the traditional methods applied in routine clinical laboratories, and how this new technique of polymerase chain reaction (PCR) may help in early diagnosis of tuberculosis.

Tuberculosis is a disease that causes more death worldwide. It's very simple contagion is causing more and more people worldwide may be infected. Due to this rapid spread many immunocompromised persons, HIV, suffer this evil enabling the disease progresses rapidly.

Laboratories use traditional methods which help in diagnosis of the disease. Use the smear, a simple, low cost Detecting bacillus Koche but lacks specificity and does not detect smaller amounts of bacilli present in certain materials such as meningoencephalitis, renal, bone and lymph pleura. Another method is to culture , being an ideal method specific for the diagnosis of pulmonary tuberculosis, since it combines the high specificity that will lack conventional radiology, will lack sensitivity that will direct microscopy, this method can increase by up to 30% positivity of the direct

examination of sputum, but due the urgency of a quick diagnosis it becomes very time consuming because the replication feature of *M. tuberculosis*, but may still not tell which member of the *M. tuberculosis* was the cause of the disease, which can confuse the diagnosis and epidemiology to aid in the diagnosis of tuberculosis, the method of polymerase chain reaction (PCR) was developed aiding in the treatment of disease and helping diagnose faster.

Keyword: Tuberculosis, smear, culture, PCR method

Introdução

A tuberculose é historicamente um importante problema de saúde pública no mundo (BIERRENBACH *et al.* 2007).

Ela teve título de capitã de todas as mortes no século XIX, sendo que em toda sua história ela nos acompanha. Estima-se que atualmente a doença esteja presente na sua forma latente em um terço da população mundial (WHO, 2003).

O avanço da Revolução Industrial ocasionou uma intensa aglomeração acarretando condições de higiene precária o que provocou um aumento nas taxas de mortalidade e morbidade por tuberculose (DORMANDY, 2000).

Ao longo de toda a história de relação entre a tuberculose e o homem, muitos escritores romancistas foram vítimas desde mal, entre eles, Frédéric Chopin, George Orwell, Eleanor Roosevelt, Vivin Leigh e muitos outros (DUCATI *et al.*, 2003).

A partir da década de 40, a descoberta de um antimicrobiano alterou mundialmente o perfil epidemiológico e assim o controle da doença.

Em 1882, o médico e bacteriologista alemão Robert Koch identificou o *M. tuberculosis* ou Bacilo de Koch (RODRIGUES *et al.*, 2007; YZQUIERDO *et al.*, 2007).

Robert Koch definiu que o *Mycobacterium tuberculosis* era um agente infeccioso a partir dos seus postulados que diziam que o patógeno deveria ser isolado do indivíduo infectado e cultivado em cultura pura e ser capaz então de reproduzir a doença (BLOOM & MURRAY, 1992).

No mesmo período da descoberta do bacilo, houve um aumento da mortalidade associada à tuberculose, principalmente em grandes centros urbanos com elevada prevalência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (WHO, 2005).

O HIV, agente etiológico da AIDS, é capaz de deteriorar o sistema imune, o que facilita a infecção ou a reatividade da TB, sendo responsável pela maior mortalidade entre os pacientes soropositivos (FATKENHEUER *et al.*, 1999).

A infecção simultânea com o HIV e o *M.tuberculosis* é capaz de infectar um grande número de indivíduos e disseminar a doença.

A maioria dos casos de tuberculose ocorre em pessoas com idade produtiva entre 15-49 anos e cerca de 80% dos casos de Tuberculose são encontradas em países em desenvolvimento como Índia, China, Indonésia e países da África subsaariana (ESPINAL 2003).

Nestes países são empregados poucos recursos no tratamento da doença, onde a infecção pelo HIV é mais comum (DUNLAP, 2000).

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 tuberculose, e aproximadamente, ocorrem em torno de 80 a 90 mil casos novos (Brasil, 2005).

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde passou a considerar a tuberculose como um problema prioritário, pois o país ocupa o 14 lugar (Dye, *et al.* 2002; Brasil, 2005; WHO 2006).

O número de óbitos por tuberculose no Brasil ultrapassa os 6.000 casos por ano (RODRIGUES *et al.*, 2007; SOUZA; SILVA, 2007). Assim, ela é a 9ª causa de internações por doenças infecciosas, ocupando o 7º lugar em gastos com internações do Sistema Único de Saúde (SUS) e é a 4ª causa de mortalidade por doenças infecciosas no Brasil (BRASIL, 2005).

Mesmo que o diagnóstico presuntivo da doença possa ser feito através de dados da história clínica e achados radiológicos, o diagnóstico definitivo ainda depende da baciloscopia e cultura.

Entretanto com avanços no campo da biologia molecular novas técnicas têm surgido para o diagnóstico de infecções por meio da detecção de sequências nucleotídicas específicas dos microrganismos (GARCÍA, 1990).

Em 1983, Kary Mullis desenvolveu uma técnica que permitiu a amplificação de uma sequência do material genético de qualquer organismo, a partir de quantidades ínfimas, e que foi denominada de PCR (Polimerase Chain Reaction).

Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos atraíram interesse considerável desde que ofereceram a oportunidade de encurtar o tempo requerido para detectar e identificar organismos do complexo *M. tuberculosis* em amostra respiratória e extrapulmonar (PIERSIMONI *et al.*, 1998).

O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica sobre os métodos convencionais de baciloscopia e cultura, apontando suas vantagens e desvantagens e apresentar o método biomolecular- POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) sendo de grande ajuda para o diagnóstico laboratorial da tuberculose.

Métodos de diagnóstico laboratorial

1) Exame Bacteriológico

1.1) Baciloscopia

É um 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: os casos bacilíferos. Por ser um método simples e seguro desde que executado corretamente em todas as suas fases, permite detectar de 70% a 80% dos casos de tuberculose pulmonar. A fase inicial do exame compreende coleta, conservação e transporte do escarro.

A microscopia direta após a coloração pelo Ziehl-Neelsen se busca bacilos álcool ácido resistente (BAAR), sendo um método barato e rápido (COLE *et al.*, 1998). Entretanto, possui baixa sensibilidade e especificidade (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999).

Este método detecta apenas 60% dos materiais clínicos de 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).

Para que o método tenha uma boa sensibilidade à amostra terá que ter a presença de 10.000 organismos por ml de amostra para que um resultado seja positivo (Kritski, 2000). Isto significa que não se pode excluir um esfregaço negativo em um caso de tuberculose uma vez que este tipo de doença pode ocorrer em outros órgãos (meninges e pleura), onde a presença do bacilo pode está em menor quantidade.

Com vistas á padronização e, portanto, á confiabilidade dos resultados da baciloscopia, os laboratórios, tanto públicos com os privados, devem estar credenciados pelo Laboratório Central-Lacen do estado e observar as instruções relativas ao material e ao fornecimento dos resultados (em cruces para as laminas positivas), bem como ao controle de qualidade, tanto do esfregaço como da microscopia.

1.2) Cultura do bacilo de Koch

A cultura de escarro é o método ideal para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, pois alia a alta especificidade que falta á radiologia convencional, á sensibilidade que falta á baciloscopia direta, podendo este método aumentar em ate 30% a positividade do exame direto de escarro.

O isolamento é feito tradicionalmente através de cultura em meios sólidos e/ou líquidos, tais como meio de Lowenstein-Jensen, o meio solido de Ogawa, e aqueles que utilizam o ágar, como o meio Middlebrook (Kudoh and Kudoh, 1974).

A cultura pode detectar de 10 a 100 bacilos por ml de material (Kritski, 2000). Pode ser liberada o diagnostico da doença mesmo nos casos em que o número de bacilos tenha sido insuficiente para uma baciloscopia positiva.

Para formas pulmonares da tuberculose, exame direto e a cultura para BK no escarro são os métodos de escolha. Todo sintomático respiratório (individuo com tosse produtiva há quatro semanas ou mais) identificado deve fazer baciloscopia do escarro.

Em pacientes HIV positivo, sempre que possível, independentemente do resultado da baciloscopia e para o diagnóstico das formas extrapulmonares, como meningoencefálica, renal, pleura óssea e ganglionar, deve-se fazer a cultura, pois a pesquisa direta do bacilo de material obtido desses órgãos geralmente é negativa.

Na maior parte das vezes, pessoas com sinais/ sintomas compatíveis com tuberculose, que nunca foram tratadas e que não têm história de contato com doentes com formas resistentes, o exame direto positivo para BAAR é suficiente para selar o diagnóstico e iniciar o tratamento (TUBERCULOSE, 2004).

Apesar de ser o padrão para a confirmação diagnóstica da tuberculose, a cultura requer mais de três semanas para um diagnóstico definitivo, pela própria característica de replicação do *M. tuberculosis*, podendo, ainda, não informar qual membro do complexo *M. tuberculosis* foi o causador da doença, o que pode confundir o diagnóstico e a epidemiologia (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999; YZQUIERDO *et al.*, 2007; KONEMAN *et al.*, 2000).

2. 0) POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Essa técnica foi descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 e tem revolucionado a genética molecular, pois possibilita uma nova estratégia na análise dos genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de sequências, dispensando todas as trabalhosas etapas de clonagem gênica (BRASIL, 2011).

A técnica consiste na amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando à produção de milhões de cópias desta sequência para que possam ser facilmente detectáveis por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias.

A amplificação dos trechos específicos do DNA se dá por ciclos com alterações de temperaturas. Existem variações de PCR a fim de melhorar a especificidade e a eficiência da reação. A amostra a ser amplificada, ou seja, a sequência alvo de um determinado gene ou parte dele constitui uma sequência de bases

previamente conhecida. O conhecimento desta sequência permite a síntese de oligonucleotídeos, que serão os iniciadores da PCR, também denominados primers.

Vários protocolos com diferentes primers vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico rápido da tuberculose.

Trabalhos realizados demonstram que a utilização de *primers* específicos para as micobactérias do complexo *tuberculosis* a PCR é capaz de, em poucas horas, definir sobre a presença ou não do patógeno na amostra e indicar a melhor terapêutica para o caso, principalmente em pacientes com HIV e pacientes muito graves que precisam de um resultado rápido e preciso.

Esta técnica pode ser bem mais refinada tornando-a capaz de não só determinar a presença da doença, mas também a sensibilidade das micobactérias aos tuberculostáticos disponíveis para o tratamento da tuberculose, além de estudos de epidemiologia molecular e tipagem de cepas em cultura (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999), sendo utilizada como uma alternativa para os métodos tradicionais.

A escolha do DNA alvo e a definição dos *primers* dentro da sequência do DNA são fatores determinantes para sua acuidade (OGUSKU; SALEM, 2004).

Resultados variados de *primers* têm sido apresentados devido à sensibilidade do teste de PCR. Os *primers* mais estudados são o IS6110, 65kDa (GroEL), 38 kDa (PhoS, CIE Ag78 ou Pab) e MPB64 (23 kDa) (OGUSKU; SALEM, 2004; ASSIS *et al.*, 2007).

Uma das regiões “alvo” mais utilizadas é a sequência de inserção de DNA (IS6110) por ser uma sequência repetitiva e específica no genoma do *M. tuberculosis* (de 1 a 20 cópias por célula), conferindo uma maior sensibilidade aos testes que utilizam essa região como amplificação (Eisenach, *et al.*, 1990).

Esta repetitiva sequência alvo no genoma prevê uma alta sensibilidade e especificidade na prova de PCR, pois quando múltiplas cópias de DNA alvo estão presentes, a sensibilidade de detecção de *M. tuberculosis* aumentará em proporção ao número de cópias, sem a necessidade de executar variações da PCR (OGUSKU *et al.*, 2003).

Apesar da sequência IS6110 estar presente em todas as *M. tuberculosis* isoladas até o momento no Brasil, estudos demonstra que esta sequência foi relatada como ausente em cepas de *M. tuberculosis* isoladas na Índia (CHAUHAN *et al.*, 2007), bem como foram detectadas sequências similares em cepas de micobactérias potencialmente patogênicas, tais como *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. chelonae* e *M. bovis* (PINTO *et al.*, 2007).

A diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* é particularmente importante, já que este último é resistente às drogas comumente usadas no tratamento da tuberculose (KATARIA, 1969).

Outro primer que tem demonstrado ser altamente específico para a *M. tuberculosis* é o MPB64.

Testado comparando-se com o IS6110, gerou menos resultados falso-positivos (MARTINS *et al.*, 2000), porém com a necessidade de realizar variações da PCR. São necessárias utilizações de controle 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 o produto de *M. tuberculosis* nos reagentes ou no processo de manipulação (Kritski *et al.*, 1996; Suffys *et al.*, 2000; Valentine-Thon, 2002). Alguns autores defendem a lavagem exaustiva do DNA obtido para eliminação de substâncias inibidoras da enzima Taq DNA polimerase (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999). Quanto mais representativa for à amostra,

melhor será o rendimento da detecção molecular (BAZZO *et al.*, 2004).

As técnicas padrão utilizadas hoje no diagnóstico da tuberculose quando comparado o custo-benefício da PCR, observa-se que o tempo para a realização do exame é entre 4 a 8 semanas e quando positiva a cultura, a amostra ainda é enviada para um laboratório de referência para ser realizado e confirmado, enquanto que o tempo necessário para a realização da PCR é, em média, um dia, reduzindo assim, o tempo para o diagnóstico final.

Para alguns autores o método de PCR é 50% mais barata do que a identificação bioquímica considerando apenas os reagentes usados. A reação de PCR é realizada por uma única pessoa onde a identificação bioquímica usualmente envolve diferentes pessoas que devem esterilizar descontaminar e manipular as culturas.

A manipulação de bactérias é mínima com PCR (SILVA *et al.*, 2001), pois não há necessidade de cultivo e crescimento de microrganismos, proporcionando otimização da segurança no laboratório.

Conclusão

Ao longo deste artigo procurou-se apresentar de forma simples os conceitos e métodos mais usados para diagnóstico laboratorial aplicado na prática de detecção da tuberculose, revisando vantagens, desvantagens e descrevendo um dos métodos da biologia molecular para o diagnóstico da doença.

O exame de baciloscopia é um método rápido e de pouco custo, mas por ser pouco sensível, é incapaz de diferenciar os tipos de micobactéria tuberculosa da não tuberculosa. Além disso, dependendo o material analisado os bacilos podem não ter a quantidade suficiente para ser considerada positiva.

Já a cultura apesar ter alta especificidade, demanda tempo para a liberação do resultado, tempo que geralmente não é disponível frente a casos graves. Com o aumento de pessoas portadoras do HIV e associada a outras micobacterioses o diagnóstico diferencial da tuberculose deve ser primordial. A letalidade da tuberculose em indivíduos imunodeficientes pode ser de 2,4 a 19 vezes maior que nos indivíduos não infectados.

Os métodos moleculares oferecem diversas vantagens, quando comparados aos convencionais: alta sensibilidade, especificidade, maior velocidade de resultados, confiabilidade, reprodutividade e possibilidade de melhorar o manejo do doente já que a presença dele no ambiente familiar e social pode oferecer alto risco de transmissão que essa doença possui.

Por usar primers que são específicos para micobacterias do complexo tuberculosis, a PCR é capaz de em poucas horas definir a presença ou não do patógeno na amostra.

Certamente quando usada com critérios e em centros de referencia, a PCR terá muita importância no diagnóstico da tuberculose.

Para kritski et al. ,para que se incorporem em rotina-diagnostica, deve-se realizar estudos controlados para padronizar

e avaliar as técnicas de biologia molecular no Brasil, com pacientes locais, considerando que a prevalência de tuberculose sempre foi muito elevada e agora também a co-infecção AIDS-TB tem sido diagnosticada com alta frequência no Brasil.

Entretanto, questões como custo-benefício ainda é um grande problema que laboratórios têm sofrido, pois é um método considerado caro para nossa realidade, seus resultados, na aplicação em espécimes clínicos, apresentam variabilidade muito grande.

Não se acredita que a PCR possa substituir ou superar plenamente os métodos tradicionais para detecção da tuberculose. O exame clínico, estudos radiológicos, a baciloscopia e a cultura algumas vezes não são suficientes para uma definição-diagnóstica e é a partir daí que esta ferramenta potente como a PCR será de grande utilidade para a definição com maior precisão e precoce instituição terapêutica.

Referencias Bibliográficas

ASSIS, N. C. S. *et al.* Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. **J. Bras. Patol. e Med. Laboratorial**, Rio de Janeiro, 2007.

BAZZO, M. L. *et al.* Relação entre a qualidade de amostras de escarro e o diagnóstico de micobactérias por PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL, Florianópolis, 2004.

Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br>>. Acesso em: 24 junhos 2012.

BIERRENBACH, A. L. *et al.* Incidência de tuberculose e taxa de cura, Brasil, 2000 a 2004. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, 2007.

BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, 1999.

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

BRASIL. Ministério da Saúde/DNTPS/CNCT. Manual de Normas Para o Controle da Tuberculose/Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia/Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária, 1995).

BLOOM, BR.; MURRAY, C.J.L.; (1992) Tuberculosis: Comentary on a Reemergent Kille. In: Science, 1992.

CHAUHAN, D. S. *et al.* Molecular typing of *M. tuberculosis* isolates from different parts of India base don IS6110 element polymorphism using RFLP analysis. **Indian J. Med. Res.**Nova Deli, 2007.

DORMANDY, T. The White death: a history of tuberculose, New York, 2002.

DUNPLAP,N.E.; BASS, J.;FUJIWANA, P.; HOPEWELL, P.;HORSBURG, C.R.;SALFINGER, M.;SIMONE, P.M. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children, 2000.

DUCATI, R; BASSO, L.A; SANTOS, D.S. O Ressurgimento da tuberculose- Revisão. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2003.

EISENACH KD *et al.* Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990.

ESPINAL, M. A. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis*, 2003.

FATKENHEUER,G.; TAEELMAN, H.;LEPAGE, P.;SCHWENK, A.;WENZEL, R.The Return of Tuberculosis. In: *Diagnostic Microbiology Infection Disease*, 1999.

KATARIA, Y. P. Observations on human infection with *Mycobacterium bovis*. **Tub. Lung. Dis.**, Nova Iorque, 1969.

KRITSKI AL, Rossetti ML, Bonfim G, Castelo, A., Mello,FCQ. Reação em Cadeia de Polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. *J Pneumol*.1997.

KUDOH, S. and T. Kudoh . "A simple technique for culturing tubercle bacilli.",1974

MARTINS, L. C. *et al.* Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal *tuberculosis*.**Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, 2000.

Ministério da Saúde. Co-infecção TB/HIV/AIDS. Brasília: MS; 1994.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de normas para o controle da tuberculose. 4ª ed. Brasília: FNS; 1995.

OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I. Análise de diferentes *primers* utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no estado do Amazonas. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, 2004

OGUSKU; SALEM, ASSIS *et al.*; OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I. Análise de diferentes *primers* utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no estado do Amazonas. **J. Bras. Pneumol.**, 2004.

PIERSIMONI, C. et al. Comparative evaluation of the new Gen-Probe *M. tuberculosis* Amplified Direct Test and Assay for Direct Detection of *M. tuberculosis* Complex in respiratory and extrapulmonary specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, 1998.

PINTO, H. J. et al. Detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas por reação em cadeia da polimerase utilizando *primers* baseados na região intergênica *plcB-plcC*. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, 2007.

RODRIGUES, L. *et al.* Resposta brasileira à tuberculose: *Macente e Ribeiro 231 Revista Saúde e Pesquisa, 2009 - ISSN 1983-1870* contexto, desafios e perspectivas. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, 2007.

SOUZA, S. S.; SILVA, D. M. G. V. Grupos de Convivência: contribuições para uma proposta educativa em Tuberculose. **Rev. Bras. Enferm.**, Brasília, 2007 . GARCÍA, M. Hibridación de ácidos nucleicos: fundamentos e aplicaciones, 1990.

Styblo, K. "The impact of HIV infection on the global epidemiology of tuberculosis." , 1991.

Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância epidemiológica/Divisão de Tuberculose. *Tuberculose: uma emergência mundial*. São Paulo; 1995.

SILVA, C. F. *et al.* hsp65 PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of micobactéria in the clinical laboratory. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 2001.

Tuberculose II Consenso Brasileiro de Tuberculose:: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004.

WHO Report 2003 Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. disponível em www.who.int/gtb.

WHO, "Global tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing", 2005.

YZQUIERDO, S. L. S. *et al.* Aplicación de RPC-PLFR em el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas. **Rev. Chil. Infectol.**, Santiago, 2007.

