

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
PNEUMOLÓGICAS**

TESE

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DA REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA MICOBACTÉRIAS NO ESCARRO
INDUZIDO EM PACIENTES COM SUSPEITA DE TUBERCULOSE
PULMONAR**

VERÔNICA DA SILVA PAIVA

Porto Alegre

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA**

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DA REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA MICOBACTÉRIAS NO ESCARRO
INDUZIDO EM PACIENTES COM SUSPEITA DE TUBERCULOSE
PULMONAR**

VERÔNICA DA SILVA PAIVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Pneumológicas da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul (*UFRGS*) como
requisito parcial a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Dra. Denise Rossato Silva

Coorientador: Dr. PAULO DE TARSO ROTH DALCIN

Porto Alegre

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Paiva, Verônica da Silva
AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DA REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA MICOBACTÉRIAS NO
ESCARRO INDUZIDO EM PACIENTES COM SUSPEITA DE
TUBERCULOSE PULMONAR / Verônica da Silva Paiva. --
2016.
71 f.

Orientador: Denise Rossato Silva.
Coorientador: Paulo de Tarso Roth Dalcin.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-
RS, 2016.

1. Tuberculose. 2. Diagnóstico molecular. 3.
Indução de escarro. I. Silva, Denise Rossato, orient.
II. Roth Dalcin, Paulo de Tarso, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico a realização deste trabalho a minha orientadora Denise Rossato Silva que me deu a oportunidade e confiança, desde nosso primeiro encontro, para construção de uma ideia de pesquisa que foi amadurecendo ao longo do tempo e que assim se encerra oportunizando-me amadurecimento tanto no aspecto profissional como pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Comissão de Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Prof. Dr. Paulo Dalcin pela oportunidade que me foi dada em estudar neste Programa em que pude alcançar os títulos tão almejados de Mestre e Doutora.

Muito obrigada aos meus orientadores Dra. Denise Rossato e Dr. Paulo de Tarso Roth Dalcin pela confiança e ensinamentos necessários a construção deste trabalho.

Aos profissionais do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (*CDCT/FEPPS*), Regina Bones Barcellos, Karen Barros Schmid, Elis Regina Dalla Costa, Maria Lucia Rosa Rossetti por todo carinho e auxílio prestado na etapa das análises das amostras.

À toda Equipe de funcionários do Setor de Pneumologia do Hospital de Clínicas, por serem sempre prestativos e atenciosos em nos auxiliar.

À toda ajuda ofertada da Técnica de Enfermagem Aline Goulart, que na ocasião era a responsável pela realização do Escarro Induzido do Hospital de Clínicas de Porto. Meu sincero, agradecimento!

Ao meu marido Cristiano da Cunha Soares que dentro das suas possibilidades e limitações de tempo, se empenhou em ajudar, principalmente cuidando do nosso filho Arthur Paiva Soares que nasceu durante o período de realização deste trabalho.

Ao amigo Guilherme Watte pelas palavras de incentivo e pelo apoio dado na etapa de correções bibliográficas.

A todos os pacientes que aceitaram participar voluntariamente confiando e acreditando que nós pesquisadores podemos em muito ajudá-los com nosso conhecimento a terem uma vida mais digna.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1. TUBERCULOSE.....	16
2.1.1. Definição.....	16
2.1.2. Epidemiologia.....	16
2.1.2.1. Epidemiologia no Mundo.....	16
2.1.2.2. Epidemiologia no Brasil.....	18
2.1.2.3. Epidemiologia no Rio Grande do Sul e em Porto Alegre.....	20
2.1.3. Patogênese.....	21
2.1.4. Diagnóstico.....	25
2.1.4.1. Sinais e Sintomas.....	25
2.1.4.2. Busca de Casos de Tuberculose Pulmonar.....	27
2.1.4.3. Diagnóstico Radiológico.....	28
2.1.4.3.1. Diagnóstico Microbiológico.....	30
2.1.4.3.2. <i>Baciloscopia de escarro</i>	30
2.1.4.3.3. <i>Cultura de micobactérias</i>	31
2.1.4.3.4. <i>PCR para micobactérias</i>	32
2.1.4.4. Escarro induzido.....	36
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. OBJETIVOS.....	42

4.1. OBJETIVO GERAL.....	42
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
5. ARTIGO EM INGLÊS.....	52
5.1. DIAGNOSTIC YIELD OF PCR TEST IN INDUCED SPUTUM OF PATIENTS WITH SUSPECTED PULMONARY TUBERCULOSIS.....	52
6. CONCLUSÕES.....	70
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFB – Acid fast bacilli

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente

BK - Bacilo de Koch

CDCT/FEPPS - Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul

CI - Confidence interval

CXR - Chest X-ray

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EI - Escarro Induzido

FDA - Food and Drug Administration

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HEPA - High Efficiency Particulate Air

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

hPCR – PCR in house

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ - Interferon-Gama

iNOS - Inducible Nitric Oxide Synthase

IQR - Interquartile Range

IS - Induced Sputum

MS - Ministério da Saúde

MTb - Mycobacterium tuberculosis

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PH - Potencial Hidroeletrólítico

ROC - Receiver Operating Characteristic

RS - Rio Grande do Sul

SD - Standard deviation

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNPT - Smear-negative pulmonary tuberculosis

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

SR - Sintomático Respiratório

TARV - Tratamento Antiretroviral

TB – Tuberculose

TB-MDR – TB multirresistente

TCAR - Tomografia Computadorizada de Alta Resolução

TLR - Toll Like Receptors

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral-Alfa

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNESP - Universidade do Estado de São Paulo

ZN - Ziehl-Nielsen

LISTA DE TABELAS

Table 1. Characteristics of study patients.....	62
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coeficiente de incidência de TB. Brasil, 2006-2015.	19
Figure 1 (artigo) - Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve for the Detection of Tuberculosis with PCR test.....	64

RESUMO

Introdução: A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) que apresenta cerca de 80% predileção pelo acometimento pulmonar. Amostras de escarro são necessárias para identificar este microrganismo e o escarro induzido (EI) tem sido um método alternativo de obtenção destas amostras, porém tem apresentado, frequentemente, resultados negativos. A cultura, considerada padrão áureo, é mais morosa em seus resultados, portanto menos útil para guiar o diagnóstico. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a metodologia mais comum para o diagnóstico rápido da TB e poucos estudos avaliaram seu papel nas amostras de EI. **Objetivo:** Determinar acurácia diagnóstica do PCR para microbactéria no EI de pacientes com suspeita de TB pulmonar e descrever características sócio demográficas, dados clínicos, radiológicos, comorbidades e hábitos comportamentais. **Métodos:** Estudo prospectivo. Pacientes internados e ambulatoriais maiores de 18 anos com sintomas respiratórios sugestivos de tuberculose pulmonar (PTB) foram convidados a participar. Os sujeitos foram entrevistados utilizando-se um questionário padronizado e o EI foi coletado. Foram obtidas três amostras para baciloscopia direta e cultura. Obteve-se uma quarta amostra para o teste de PCR. **Resultados:** Foram avaliadas 116 amostras de escarro induzido. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da PCR foram de 95,2%, 48,4%, 29,0% e 97,9%, respectivamente. A área sob a curva ROC foi de 0,72 para o teste de PCR ($P < 0,0001$). **Conclusões:** Embora a especificidade da PCR possa ser subestimada, se considerarmos a PCR mais sensível do que os métodos de cultura utilizados pensaram que esses testes positivos para PCR significam falsos positivos. Os resultados de PCR devem ser sempre interpretados cuidadosamente em conjunto com informações clínicas.

Palavras-chave: Tuberculose, Diagnóstico, Indução de Escarro, Solução Salina Hipertônica, Baciloscopia Negativa, Diagnóstico Molecular.

ABSTRACT

Introduction: Induced sputum (IS) is an alternative method of obtaining sputum, but IS smears are frequently negative. Culture is more time-consuming in its results, and less useful to guide the diagnosis. Polymerase chain reaction (PCR) is the most common methodology for rapid diagnosis of tuberculosis and few studies evaluated its role in IS samples.

Objective: The objective of this study is to determine the diagnostic yield of PCR for TB compared with culture in IS samples. **Methods:** Prospective study. Inpatients and outpatients > 18 years with respiratory symptoms suggestive of PTB were invited to participate. Subjects were interviewed using a standardized questionnaire, and collected IS. Three samples were obtained for AFB smear and culture. A fourth sample was obtained for PCR test. **Results:** A total of 116 induced sputum samples were evaluated. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of PCR were 95.2%, 48.4%, 29.0%, and 97.9%, respectively. The area under the ROC curve was 0.72 for the PCR test ($P < 0.0001$).

Conclusions: Although the PCR specificity could be underestimated, if we consider PCR to be more sensitive than the culture method used, we thought that these PCR positive tests means false-positives. PCR results should always be interpreted carefully in conjunction with clinical information.

Keywords: Tuberculosis; Diagnosis; Induced sputum; Saline solution, hypertonic; Smear-negative tuberculosis; Molecular diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

Casos de tuberculose (TB) pulmonar com baciloscopia negativa correspondem a 30 - 60% de todos os casos da doença, de acordo com a região estudada. No caso do Brasil este percentual varia de 24 a 30% nos adultos (1,2). Esta situação é considerada grave, pois possibilita atraso no diagnóstico, repercutindo em um aumento de 25% nos casos de óbitos, principalmente em pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (3,4). Além disso, embora os pacientes com baciloscopia positiva sejam considerados mais infecciosos, 10 a 20% das transmissões de TB em nível populacional são atribuíveis aos casos com baciloscopia negativa (5-7). Nestes casos ou naqueles que apresentam pouca expectoração, os métodos alternativos para a obtenção de amostras de escarro ocorrem através do exame de broncoscopia e da técnica de Escarro Induzido (EI).

A broncoscopia é um procedimento considerado invasivo, que requer equipe clínica especializada e por ser oneroso não é amplamente disponível em situações de contextos de recursos limitados. Contrariamente, o EI é uma alternativa menos dispendiosa, não invasiva, bem tolerada, e que apresenta rendimento microbiológico semelhante ao da broncoscopia (8-11).

No entanto, em locais com alta prevalência da coinfeção TB-HIV, observa-se que o resultado do esfregaço da amostra de escarro obtido através da técnica de EI é frequentemente negativo, sendo, portanto o diagnóstico preciso dependente do resultado do exame de cultura. Este aumenta o rendimento diagnóstico nestes casos de esfregaço negativo e é o exame considerado padrão áureo para o diagnóstico de certeza da TB (12). Apesar disso, a aquisição do resultado é bem mais demorada, em torno de 2 a 8 semanas o que leva ao atraso no diagnóstico e, portanto menos útil no processo de tomada de decisão clínica (10).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é um método de diagnóstico molecular considerado rápido, pois em duas horas é possível a obtenção de seu resultado. Atualmente vem apresentando aumento de sua aplicabilidade nos serviços de saúde brasileiros. As amostras de escarro a serem analisadas por este procedimento podem ser obtidas através de expectoração espontânea ou induzidas (13,14).

Em amostras de escarro espontâneo, a PCR para TB fornece alta especificidade, e a sensibilidade varia de 36% a 97%, dependendo dos resultados das amostras também analisadas pela cultura (15). Entretanto, poucos estudos (16-19) avaliaram seu papel em amostras obtidas pelo EI. O objetivo deste estudo é, portanto, determinar acurácia diagnóstica do PCR para microbactéria no EI de pacientes com suspeita de TB e descrever características sócio demográficas, dados clínicos, radiológicos, comorbidades e hábitos comportamentais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. TUBERCULOSE

2.1.1. Definição

A TB é uma doença causada por um agente específico, o *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), variedade humana das micobactérias, é nos dias atuais, o agente etiológico mais importante causador da TB no homem. Este microrganismo foi descoberto por Robert Koch em 1882, e por isso costuma ser também denominado “Bacilo de Koch” (BK). Apresenta uma maior predileção pelo acometimento pulmonar, o que ocorre em cerca de 80% das vezes (20,21).

2.1.2. Epidemiologia

2.1.2.1. Epidemiologia no Mundo

A TB foi considerada uma situação de emergência mundial em 1993 devido a elevadas taxas de incidência, e desde então indicadores epidemiológicos vem sendo acompanhados em todo o mundo. Várias políticas de saúde foram criadas tanto de abrangência internacional como de cada país individualmente devido às diversas diferenças encontradas entre eles. Há duas décadas a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou o Sistema de Monitoramento Global da TB que permite acompanhar vários indicadores, a fim de conhecer e compreender o comportamento desta enfermidade no mundo (22).

Historicamente, a TB recrudescceu na década de 80, sobretudo pela ocorrência da HIV-AIDS e sempre denotou um comportamento de altas taxas de incidência, especialmente nos países mais pobres. Porém, a partir de 2014 perceberam-se modificações neste panorama mundial, destacando redução de número de casos, especificamente documentada no ano de 2015 em relação aos anos anteriores. Os países mais ricos da Europa, Estados Unidos, Canadá, Áustria e Nova Zelândia foram os responsáveis apresentando 10 casos/100 mil habitantes em 2015. Todavia, outros países ainda mantêm elevadas taxas de incidência, prevalência e mortalidade como é o caso do Brasil, Camboja, China, Etiópia, Índia, Mianmar, Filipinas, Uganda, Vietnã e Paquistão (22).

Em 2015, foram notificados 6,1 milhões de novos casos de TB mundialmente, e os países Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul contabilizaram 60% deste total. O comportamento da incidência da doença em relação ao gênero mantém uma proporção de 1:7 casos nos homens em relação às mulheres. Também se percebe menores taxas encontradas em crianças com idade inferior a 15 anos, que neste mesmo ano apresentou um percentual de 6,3% do total de casos (23).

Mundialmente, a relação de casos de pacientes com TB e infectados pelo HIV vem demonstrando que as maiores notificações se encontram na Região Africana (90%). Em 2015, 55% dos pacientes notificados com TB globalmente tinham resultados do teste de HIV, e a proporção de pacientes com TB/HIV e que estavam em tratamento antiretroviral (TARV) foi de 78% (23). Observa-se um significativo declínio desta coinfeção nos países desenvolvidos, cuja ocorrência maior se dá em imigrantes. Nos Estados Unidos, por exemplo, 70% dos casos foram nesta população, correspondendo a 7% em latino-americanos, 8% em negros e 25% em asiático-americanos (24).

Apesar de a doença ter tratamento eficaz que pode evoluir para a cura, o número de casos de óbitos ainda é considerado alarmante. Em 2014 foram 1,1 milhões de notificações de óbitos e infelizmente em 2015, percebeu-se aumento de 0,3 milhões nestas notificações. O número de óbitos somente nos casos de TB sem a coinfeção TB/HIV também vem aumentando; em contrapartida as mortes de pacientes coinfectados estão diminuindo. Fato atribuído ao TARV ofertado, uma vez que pode reduzir em 65% a morbimortalidade (22,23,25).

Outra situação que vem sendo preocupante é a TB multirresistente (TB-MDR), que pode comprometer o tratamento e a cura e, se associado à infecção pelo HIV, potencializa desfechos desfavoráveis da doença (26). Em 2015, estimou-se 480 mil novos casos de TB-MDR, sendo a Índia, China e Rússia os países responsáveis pelas maiores notificações (23).

2.1.2.2. Epidemiologia no Brasil

Os dados do relatório global da TB trazem estatísticas de 205 países e territórios que juntos correspondem a 99% da população mundial. Vinte e dois destes países integram o grupo que tem 80% das maiores taxas de notificação, sendo o Brasil o ocupante da 18ª posição, com 0,9% dos casos estimados no mundo e 33% das Américas (23). Ao longo de dez anos (período compreendido entre 2006 e 2015) a taxa de incidência da doença foi reduzida no país, conforme se visualiza na Figura 1.

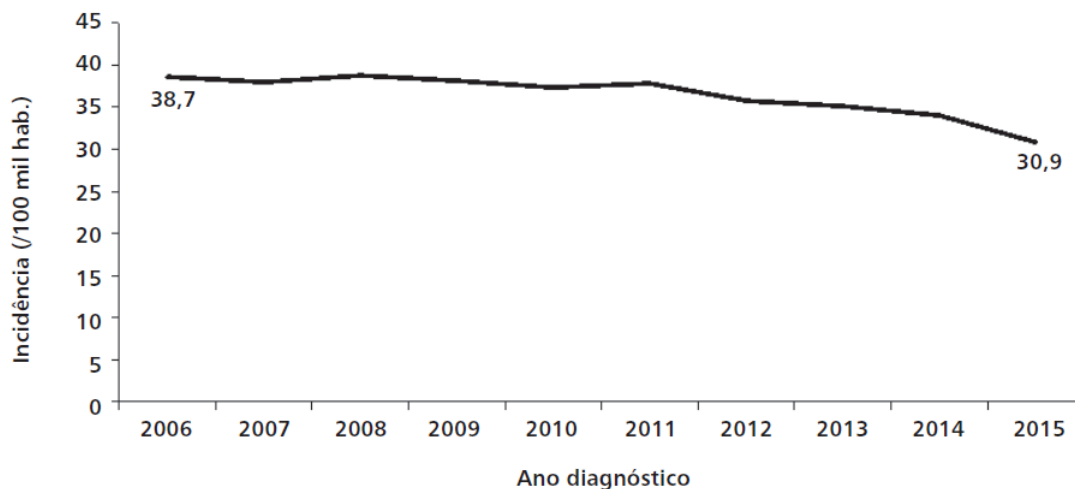


Figura 1 – Coeficiente de incidência de TB. Brasil, 2006-2015.

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), Boletim Epidemiológico, 2016.

Em 2015 foram notificados 81.137 casos da doença, sendo 72.221 de TB primária com 87% na forma clínica pulmonar, 73% confirmados por teste bacteriológico e 82% dos casos apresentando testagem para HIV. A taxa de co-infecção TB/HIV foi de 15% (23,27).

Quanto à distribuição da doença nas capitais brasileiras, em 2015, Manaus/AM (98,3/100 mil hab.), Porto Alegre/RS (88,8/100 mil hab.), Recife/PE (78,3/100 mil hab.) e Rio de Janeiro/RJ (66,8/100 mil hab.) foram as de maiores destaque, todas com coeficientes de incidência superior ao valor nacional (30,9/100 mil habitantes). As menores taxas ficaram na região Centro/Oeste, Goiás - 11,0/100 mil habitantes (27).

Em relação à distribuição da doença por gênero e idade, ainda se observa uma prevalência 2,1 vezes maior nos homens economicamente ativos em relação às mulheres e também nos indivíduos em vulnerabilidade social. Ainda, 57,5% dos casos ocorreram em negros e também nesta população observaram-se taxas inferiores de cura. Quanto à escolaridade, 60,4% dos pacientes com TB tinham menos de oito anos de estudo (28).

Em relação ao desfecho da doença, houve 74,2% de cura, portanto taxa inferior a preconizada pela OMS, que é de 80%. O destaque para este desfecho foi a Região Norte, especificamente o estado do Acre que apresentou 87,3%, seguida da Região Sudeste, representada pelo estado de São Paulo (82,8%). Com relação à taxa de abandono, o país ainda vem apresentando taxas elevadas (11%) ao comparar com as metas internacionais permitidas pela OMS (5%), a Região Sul foi a que demonstrou o maior percentual de abandono (12%) (23,27).

2.1.2.3. Epidemiologia no estado do Rio Grande do Sul e na capital Porto Alegre

O comportamento das taxas de incidência da doença no Rio Grande do Sul demonstra que desde 1993 se observa elevadas taxas. Em 2011 foi de 46,8 casos/100 mil habitantes, bem superior à média nacional para este mesmo ano que foi de 35 casos/100 mil habitantes. Mais recentemente, em 2014, apresentaram 33,5 casos/100 mil habitantes, portanto uma redução e isto fez refletir na possibilidade do Estado estar no caminho de atingir as consideradas metas nacionais de controle da doença (23,29,30,31).

Quinze municípios contemplam a ocorrência da doença, os chamados municípios prioritários, são eles: Alvorada, Porto Alegre, Canoas, Sapucaia do Sul, Viamão, Cachoeirinha, Rio Grande, Guaíba, Santa Maria, Gravataí, São Leopoldo, Pelotas, Novo Hamburgo, Santa Cruz do Sul e Uruguaiana. A região Metropolitana e a Capital, Porto Alegre, são as detentoras das maiores taxas. Alvorada se destacou em 2013 sendo a cidade que apresentou a maior taxa de incidência do país, passando a frente da capital, que sempre se comportou como uma cidade de alta incidência entre as capitais brasileiras (29,30).

Em 2014, o coeficiente de incidência de Porto Alegre foi de 99,5/100 mil habitantes e um ano depois foi de 88,8/100 mil habitantes. Embora se observe este declínio, a cidade ainda apresenta uma posição desfavorável em relação a outras capitais do país (21,17). O coeficiente de mortalidade em 2015 foi de 2,3/100 mil habitantes, sendo, portanto o maior em comparação aos estados do Paraná (1/100 mil habitantes) e Santa Catarina (0,9/100 mil habitantes) (27).

Em relação à realização de exame de cultura, 29,3% foi o percentual encontrado no Estado, e 32,9% em Porto Alegre. Quanto ao desfecho da doença, 42,1% apresentaram cura nos casos confirmados laboratorialmente no Estado e Porto Alegre apresentou percentual inferior (35,9%). O abandono no RS foi de 33,5% e na capital de 45,6%, ambos bem superiores à média nacional permitida (5%) (27).

Sabe-se que o recrudescimento desta doença tem relação direta com a infecção pelo HIV, desta forma complicando todo o manejo e alterando o curso de gravidade desta enfermidade. Em 2014, o RS foi o segundo Estado brasileiro a apresentar a maior taxa de detecção de AIDS que foi de 38,3 casos para cada 100 mil habitantes, sendo Porto Alegre a capital nacional com a maior taxa, totalizando 94,2 casos para cada 100 mil habitantes. As taxas de realização do teste HIV estão acima de 80% e em 2015, 25,2% dos casos novos de TB e 43,6% dos casos de retratamento da TB tinha infecção pelo HIV (22,23,28).

2.1.3 Patogênese

A compreensão acerca do porquê algumas pessoas adoecem quando em contato com o agente causador da TB enquanto outras não é o grande desafio do estudo da patogênese desta doença. Apesar de todos os avanços tecnológicos acerca do conhecimento das propriedades do agente etiológico e dos mecanismos de defesa do organismo frente à infecção, a

patogênese da TB ainda é considerada bastante complexa (20,21). Acreditava-se que o MTb teria sido uma forma modificada do *Mycobacterium bovis*, um microrganismo com menor capacidade aeróbica e com definida preferência pelo comprometimento ósseo, atestado por lesões diversas documentadas na antiguidade em múmias egípcias (33). Avanços nas ferramentas de investigação molecular, em especial estudos genéticos das micobactérias (sequenciamento), demonstraram que, com genomas muito semelhantes, essas duas espécies (34) devem ter se originado de um ancestral comum, o que se contrapõe à teoria evolutiva anterior (35,36).

O complexo MTb inclui diversas espécies: *M. microti*, *M. canetti*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *Mycobacterium bovis* e o *bovis* BCG. Todas estas formas apresentam características de terem formato pequeno, medindo aproximadamente de 1 μ a 10 μ de comprimento por 0,2 μ a 0,6 μ de largura, possuírem imobilidade, sem esporos e com crescimento considerado lento, geralmente em torno de 20 horas na presença de fatores predisponentes, como oxigênio, alguns nutrientes e o pH do meio em que se encontra. São considerados sensíveis ao calor, radiação e na presença de tinturas apresentam resistência ao álcool e ácido, o que os tornam BAAR (bacilos álcool ácidos resistentes) (37).

Para compreender a patogênese desta doença, vários fatores são levados em consideração, tais como: patogenicidade, carga infectante, virulência, resistência natural e adquirida e a hipersensibilidade do hospedeiro. Fatores estes que determinaram através da fórmula matemática proposta por Rich em 1944 ($P = NVH / (Rn + Ra)$), que a probabilidade (P) de uma infecção tuberculosa evoluir para doença está relacionada diretamente ao número de bacilos infectantes (N), à sua virulência (V) e à reação de hipersensibilidade (H) que ela provoca, e inversamente relacionada à resistência natural (Rn) e adquirida (Ra) do organismo infectado (38).

O risco de exposição do organismo ao bacilo da TB está relacionado a alguns aspectos epidemiológicos como número de casos infectantes, ou seja, indivíduos adultos com doença pulmonar escavada na comunidade, o tempo de duração da infecção, a magnitude e natureza das interações entre a pessoa livre de infecção com a doente, a densidade populacional, fatores climáticos e tipo de ocupação profissional. Idade, presença da *diabetes mellitus*, transplante de órgão, insuficiência renal crônica, infecção pelo vírus HIV, alcoolismo e tabagismo, são fatores que aumentam a probabilidade da infecção tornar-se doença (39).

A transmissão acontece quando indivíduos adultos, portadores de TB pulmonar ativa, através dos atos de tossir, espirrar, falar alto ou cantar eliminam diminutas gotículas, cada uma delas contendo bacilos, constituindo as gotículas de *Flügge*. Estas apresentam condições aerodinâmicas de penetrarem no sistema respiratório e atingirem os alvéolos pulmonares. Um indivíduo doente pode infectar cerca de 10 pessoas no período de um ano, e uma ou duas destas podem desenvolver clinicamente a doença. Portanto, a infecção pelo Mtb pode ter três desfechos: 1) ser controlada na porta de entrada devido à integridade imunológica do indivíduo; 2) tornar-se doença ativa, e 3) pode permanecer na forma latente por longos anos (39,40,41).

Em relação à integridade imunológica, ao longo do tempo e das possíveis exposições vivenciadas, o aparelho respiratório desenvolveu determinados mecanismos de proteção tais como: cílios nasais, o próprio reflexo da tosse e a depuração mucociliar. Quando os bacilos não são barrados por esta depuração, poderão atingir os alvéolos para assim iniciar sua multiplicação. Os macrófagos, células extremamente importantes na defesa inicial, já dentro dos alvéolos são liberadores de substâncias, como as quimiocinas que irão ativar outras células também importantes de defesa, como os monócitos, neutrófilos, linfócitos T, e todos irão atuar na tentativa de provocar *apoptose* ou morte programada destes bacilos (39,40,41).

Receptores diversos, como de complemento (CR1, CR2 e CR3), de manose, e outros de superfície celular, como a fibronectina, receptor fração de Fc de imunoglobulinas e, mais recentemente, os receptores *Toll-like*, encontram-se aí envolvidos. A liberação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), é extremamente importante, uma vez que secreta óxido nítrico, componente altamente tóxico para o bacilo (41).

Apesar de nenhuma célula ser capaz de destruir efetivamente os bacilos, elas por sua vez interagem liberando citocinas antimicobacterianas, as quais tornarão o ambiente ainda mais desfavorável ao crescimento dos bacilos por liberarem IFN- γ (interferon-gama) e TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), produzirem óxidos tóxicos derivados de nitrogênio e provocarem lise no fagolisossomo. Todavia, todas essas ações não se mostram completamente capazes de destruir a micobactéria, especialmente quando o indivíduo contaminado a enfrenta pela primeira vez (primoinfecção) (42).

Em 5% dos casos a infecção não é contida pelo sistema de defesa do hospedeiro, evoluindo para doença. Nesta evolução haverá a formação do cancro de inoculação ou o complexo de *Gohn*, momento em que pode ocorrer a disseminação linfática e a inflamação do gânglio regional que irá formar o complexo primário, traduzido pelo enfretamento de um indivíduo previamente hígido ao MTb. Também pode existir a ocorrência da disseminação sanguínea e desta maneira os bacilos podem atingir outros órgãos (43).

O padrão de resposta do hospedeiro quando ele estiver enfrentando uma primeira infecção (TB primária), mais comum em crianças, será diferente daquele de um enfrentamento ulterior (TB pós-primária), a partir de uma nova infecção (reinfecção exógena), ou da reativação de bacilos em estado latente presentes nos tecidos (reinfecção endógena) (40).

2.1.4. Diagnóstico

2.1.4.1. Sinais e Sintomas

As manifestações clínicas da TB envolvem a presença de sinais e sintomas pulmonares, como tosse, expectoração, hemoptise, dispneia e dor torácica, bem como sinais e sintomas não específicos do sistema respiratório, como perda de peso corporal, febre, sudorese noturna e mal estar. Sabidamente, o reconhecimento de pacientes com a doença em fase inicial pode precocemente diagnosticar e introduzir o tratamento e assim interromper sua cadeia de transmissão (31).

A tosse é um sintoma muito comum nos pacientes com TB pulmonar e aparece de forma considerada crônica, pois envolve uma duração de 3 (três) semanas de seu surgimento. Inicialmente se apresenta na forma improdutiva, com pouca ou quase nenhuma produção de muco, mas com a evolução da doença torna-se produtiva com escarro variando de purulento a sanguinolento (44,45). Um estudo realizado por pesquisadores brasileiros que avaliaram o impacto da detecção de casos de TB em grupos de pacientes com tosse maior que 3 (três) semanas e menor que 1 (uma) semana, demonstrou que a redução do tempo de tosse para menor que 1 (uma) semana foi determinante para aumentar o número de identificação de casos e não acarretou em aumento de carga de trabalho para o sistema de saúde (46).

A hemoptise é outro sintoma encontrado nos pacientes com TB pulmonar. Em um estudo sobre as causas da hemoptise em pacientes hospitalizados no setor de pneumologia de um hospital do nordeste do Brasil, dos 50 casos de hemoptise encontrados, 4 (10,3%) foram por TB pulmonar em atividade e 19 (48,7%) por bronquiectasia. Embora, a hemoptise tenha sido pouco relatada, os autores deste estudo relatam a relação da bronquiectasia e da

hemoptise com a infecção pelo MTb, pois este microorganismo pode causar dilatações nos brônquios, assim formando as bronquiectasias e portanto aumentando as chances de ter hemoptise (47).

A febre no caso da TB pode ser acima de 38°C, e ocorrer por longo período de forma intermitente ou somente noturna. Esta manifestação ocorre pelo processo inflamatório causado pelo MTb que ativa as células de defesa produzindo prostaglandinas e mediadores inflamatórios, os quais alcançam o hipotálamo, permitindo elevadas variações de temperatura corporal. A febre pode acometer mais de 50% dos pacientes e pode vir acompanhada de sudorese noturna (48).

A dispneia no início da doença aparece em decorrência da realização de esforço físico, todavia, com a evolução, passa a surgir também no repouso. Este achado clínico, geralmente, é encontrado em casos bem avançados da doença, sobretudo em pacientes infectados pelo HIV, estando associado a padrões fibróticos e comprometimento pleural (derrame pleural e pneumotórax) (48).

A dor torácica, considerada pouco comum, aparece em casos de comprometimento pleural e também pelo esforço causado pela tosse crônica. Emagrecimento é frequente e proporcional ao tempo e à extensão da doença, sendo que os pacientes costumam perder de 5 a 10 quilos em poucas semanas (48,49). Boffo et al (50) ao estudar a associação da TB com AIDS mostraram que a febre foi a manifestação clínica mais frequente, ocorrendo em 64,5% dos indivíduos com ambas as condições, seguida de sudorese noturna, emagrecimento e astenia, sendo a tosse encontrada em somente 22,0% dos casos.

Silva et al (51) ao realizar um estudo em um hospital terciário na cidade de Porto Alegre/RS, verificaram que dos 305 pacientes com TB pulmonar, a febre foi o sintoma mais encontrado (n=190/62,3%), seguida de tosse (n=132/43,3%) e sudorese noturna

(n=74/24,3%). Além disso, a tosse e a febre foram mais comuns no grupo de paciente que obtiveram o diagnóstico no tempo inferior a seis dias. Em outro estudo, os sintomas mais frequentes foram tosse (98,5%), febre (82,0%) e sudorese noturna (83,0%) (49).

2.1.4.2. Busca de casos de Tuberculose Pulmonar

Estratégias que visem encontrar pacientes com TB pulmonar ativa vêm sendo documentadas desde a década de 60. Nos anos 70 e 80, pesquisadores no Quênia e na Índia verificaram presença de TB pulmonar ativa nos indivíduos que procuraram os serviços de saúde com sintomas respiratórios. Esta demanda aumentou a preocupação com estes pacientes e assim possibilitou maiores investimentos para a qualidade da atenção dada a eles (52).

Segundo as orientações da OMS e de acordo com diretrizes governamentais brasileiras, os serviços públicos em todos os níveis de atenção à saúde devem assegurar a realização da pesquisa de BAAR em amostras de escarro de indivíduos com tosse por um período de pelo menos três semanas e a estes indivíduos denominou-se de sintomáticos respiratórios (SR) (53). Para tanto, se estabelece no Brasil um percentual de encontrar um SR em 1% da população geral, ou em 5% das primeiras consultas dos indivíduos com 15 anos ou mais nos serviços de saúde (45).

A partir da caracterização desses pacientes, surgiu a estratégia de busca de casos de SR, a qual corresponde a uma atividade multiprofissional orientada a identificar indivíduos com tosse por um tempo igual ou superior a três semanas através da investigação clínica sobre a presença deste sintoma, da realização de exames de baciloscopia direta e em alguns casos da solicitação do exame de radiografia torácica. Estes pacientes apresentam maior possibilidade

de diagnóstico de TB pulmonar e esta estratégia tenta garantir a detecção dos casos bacilíferos que são os responsáveis pela cadeia de transmissão da doença (31,44).

Esta busca de casos TB pulmonar pode ocorrer tanto de forma ativa como passiva. A primeira acontece quando indivíduos com tosse não procuram serviços de saúde espontaneamente ou quando assim o fazem não é por este sintoma, já a passiva quando os SR procuram os serviços espontaneamente (44).

No Brasil, em nível Municipal, Estadual e Federal observam-se dificuldades, ora financeiras, ora operacionais, nas ações de prevenção, diagnóstico e tratamento da TB. Isto acarreta dificuldades nas ações de busca de casos, uma vez que esta estratégia acaba ocorrendo quase que exclusivamente em unidades de referência da doença (54).

Murray e Salomon (1998) (55) ao considerar custos e prevalência da TB no mundo, verificaram que estratégia de busca de casos ativa associada ao tratamento diretamente observado pode trazer significativos benefícios em regiões com elevadas taxas de prevalência da doença, desta forma contribuindo para a redução das taxas de mortalidade. No entanto, ainda se percebe atraso no diagnóstico, ocorrido pela inadequada avaliação dos pacientes sintomáticos respiratórios por parte dos serviços de saúde ou pelo retardo na procura por atendimento por parte dos pacientes.

2.1.4.3. Diagnóstico Radiológico

A investigação radiológica torácica, apesar de não ter boa especificidade, é um exame muito utilizado na prática clínica por ser de baixo custo e não invasivo, embora existam outros métodos diagnósticos por imagem muito mais precisos, como o caso da tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR). Pesquisadores da Universidade do Estado de São

Paulo (UNESP) em Botucatu/SP (2010) observaram que os padrões tomográficos de alto comprometimento de área pulmonar estavam bem relacionados com o processo inflamatório em 16 pacientes com diagnóstico confirmado de TB (56). Apesar desta precisão, a TCAR tem sido utilizada na prática médica em pacientes suspeitos de TB pulmonar com radiografia do tórax normal ou com demonstração de alguma alteração duvidosa, no entanto seu custo é cerca de dezenove vezes maior em comparação ao exame de radiografia torácica (45).

A radiografia torácica associada com a avaliação da baciloscopia e de aspectos clínicos e epidemiológicos é considerada um dos principais métodos de investigação inicial e também de acompanhamento da doença (57). As principais alterações pulmonares radiológicas em pacientes com TB pulmonar são: infiltrados, opacidades parenquimatosas, linfonomegalias, cavidades, atelectasias, micronódulos e derrames pleurais, este último comum em 25% dos adultos. Em até 15% dos casos confirmados de TB pulmonar a radiografia de tórax pode ser normal (58,44).

Nos casos de TB pulmonar primária, opacidade parenquimatosa juntamente com presença de linfonomegalias hilares ou mediastinais são as manifestações mais sugestivas (58). As primeiras acometem lobos superiores na infância e lobos médio e inferior em adultos; já a segunda é observada na maioria das crianças e em até 40% dos adultos (44).

Na TB pulmonar pós-primária, encontram-se com mais frequência lesões cavitárias únicas ou múltiplas localizadas nos seguimentos lobares superiores (apical e posterior) e nos seguimentos superiores dos lobos inferiores que, quando curadas, sofrem modificações teciduais tornando-se fibróticas, provocando alterações na arquitetura do parênquima pulmonar, formação de bronquiectasias de tração, desvio das estruturas mediastinais e tuberculomas (44,58).

As manifestações radiológicas nos pacientes com coinfeção TB-HIV dependerão do estado imunológico encontrado, sendo a contagem de células linfocitárias T CD4⁺ extremamente importante, uma vez que naqueles casos com contagem abaixo de 200 células/mm³ de sangue, as alterações podem ser completamente atípicas e em 10-20% dos casos podem nem existir. Naqueles com contagem de CD4⁺ superior a 500 células/mm³, as manifestações de imagens encontradas tornam-se semelhantes às de pessoas sem imunossupressão (59).

2.1.4.4. Diagnóstico Microbiológico

2.1.4.4.1. *Baciloscopia de escarro*

Segundo orientações da OMS, a realização da pesquisa bacteriológica direta em amostras respiratórias é de fundamental importância para a confirmação do diagnóstico microbiológico da TB pulmonar. A baciloscopia de escarro baseia-se na utilização de corante específico para micobactéria a fim de identificá-la; como rotina, no Brasil, utiliza-se o padrão de coloração de *Ziehl-Nielsen* (ZN), o qual determina a capacidade das micobactérias em reter a fucsina ou hidrocloreto de rosanilina e se apresentar como bastonetes, ligeiramente delgados, corados em vermelho com fundo azul, que não descora com álcool-ácido, sendo por isso referido como bacilo álcool ácido resistente (BAAR) (44).

Ainda que este exame seja o método diagnóstico de eleição adotado pelos serviços de saúde pública do Brasil, em torno de 24% a 30% dos pacientes que recebem terapêutica para a TB pulmonar não têm a confirmação bacteriológica, sendo o diagnóstico elaborado e o tratamento prescrito com base no quadro epidemiológico-clínico-radiológico (2).

A baciloscopia apresenta um valor preditivo positivo maior que 95%, mas com sensibilidade variando de 40 a 60% (44). A sensibilidade e especificidade deste método dependerão de alguns fatores como: experiência técnica dos profissionais envolvidos, forma de apresentação clínica da doença, quantidade de bacilos presentes na amostra de escarro a ser examinada, cuidados na coleta, conservação e transporte destas amostras, e da qualidade nos recursos laboratoriais disponíveis (60). Para se encontrar um resultado positivo no exame de baciloscopia direta faz-se necessária a presença de um número mínimo, da ordem de 5 a 10 mil por ml de amostra a ser analisada (20,61).

2.1.4.4.2. Cultura para micobactérias

A cultura do MTb é um método de exame considerado padrão áureo no diagnóstico da TB pulmonar. Consiste no isolamento e identificação das micobactérias utilizando meios sólido e/ou líquido que pode detectar 10 bacilos/mL de espécime. Além de promover este isolamento, pode testar a sensibilidade aos quimioterápicos utilizados no tratamento desta doença. Rotineiramente, nos serviços de saúde brasileiros, utilizam-se o meio sólido de *Loewenstein-Jensen* e o *Ogawa-Kudoh*, pois apresentam menores custos e índices de contaminação (36,44).

A cultura é indicada nos pacientes que apresentam clínica sugestiva de TB pulmonar com resultado negativo no exame de baciloscopia e presença de exame radiológico com sinais sugestivos da doença. Também é bastante utilizada para o diagnóstico da TB extra-pulmonar, nos pacientes HIV positivos, pois nestes casos frequentemente a baciloscopia é negativa devido à baixa quantidade de bacilos no escarro. Também é indicada no acompanhamento do paciente que esteja em retratamento e nos casos de populações mais vulneráveis a adquirir a

doença e com possibilidade de cepas mais resistentes, como os presidiários, moradores de rua, indígenas, idosos institucionalizados e profissionais da área de saúde (44,31).

Por conseguir detectar um número pequeno de bacilos, a cultura apresenta rendimento diagnóstico variando de 20-40%. Em termos de custos tem valor superior à baciloscopia, porém inferior a outros exames diagnósticos, como os testes moleculares (44).

Apesar de ser exame considerado padrão áureo, estudos destacaram a possibilidade de resultados falso-positivos, sobretudo devido à contaminação durante os exames nos laboratórios e a detecção de micobactérias não tuberculosas (micobactérias atípicas) (34). Também há possibilidade de resultados falsos negativos os quais podem ocorrer devido a problemas técnicos no tratamento do material a ser analisado, uso de meios de cultura inadequados, incubação por tempo insuficiente, exposição do material à luz e calor excessivos e armazenamento da material por tempo prolongado (57).

Consideravelmente, um dos maiores problemas da aplicabilidade do exame de cultura está relacionado ao tempo transcorrido para se obter o resultado, o qual gira em torno de oito semanas, e isto tem determinado menor aplicabilidade na rotina dos serviços de saúde e conseqüentemente na prática diária de atendimento dos casos, para a tomada da decisão terapêutica. Outro aspecto relevante é a necessidade de laboratório com disponibilidade de maior tecnologia e equipe de profissional qualificada (31,44).

2.1.4.4.3. PCR para micobactérias

Com a descoberta da estrutura da molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), a partir da década de 50 grandes progressões ocorreram na área da biologia molecular, uma vez que a perspectiva de identificação e isolamento da sequência de ácidos nucleicos de variados

microorganismos patogênicos, possibilitaria numerosos avanços no diagnóstico de muitas doenças infectocontagiosas (62).

Aprimoramentos nos testes moleculares ocorreram ao longo do tempo e, a partir disso, puderam-se diferenciar as categorias das espécies as quais pertenciam os organismos em análise. Vários alvos de genomas, os chamados *primers*, foram identificados e no caso da identificação do DNA do MTb considerou-se a sequência IS6110 como a mais utilizada, pois pode chegar a alcançar até 20 cópias do genoma e isto aumentou sobremaneira a especificidade e a sensibilidade no diagnóstico (60,62-63-64).

A PCR é um teste molecular que pode detectar menos de um fragmento de DNA e é capaz de em poucas horas determinar a presença do agente causador da doença ajudando na escolha terapêutica mais adequada, além de poder testar a sensibilidade aos fármacos utilizados (65).

No final da década de 80, os pesquisadores Brisson-Noel, (66) descreveram o uso da técnica de PCR para detectar a sequência do DNA do MTb em amostras clínicas. E a partir de então, muitos testes vem sendo utilizados no Brasil, testes estes que podem ser artesanais – *kits in house* (hPCR) ou comercializados (66,67). Os primeiros apresentam a vantagem de serem mais acessíveis em relação a custos, mas tanto estes quanto os comercializados devem seguir orientações quanto à padronização técnica de sua utilização, ou seja, identificação da região do DNA que será ampliada e a detecção exata dos fragmentos que serão amplificados (68).

Em uma metanálise (69) realizada por um grupo de pesquisadores italianos para verificar a sensibilidade e especificidade do uso de técnicas de hPCR para o diagnóstico de TB com baciloscopia positiva, utilizando a cultura como padrão ouro, foram incluídos 35 artigos. A sensibilidade encontrada foi 0,96 (IC95%: 0,95-0,97) e a especificidade de 0,81

(IC95%: 0,78-0,84), sendo que a grande variação da especificidade limitou a aplicabilidade clínica dos hPCR. Este levantamento também considerou que a hPCR pode ser usada com confiança para excluir TB em pacientes com baciloscopia positiva, que sua baixa especificidade pode levar equivocadamente ao início da terapêutica anti-TB e sugerem que futuros estudos excluam pacientes previamente tratados da doença.

Em dezembro de 2010, a OMS recomendou a utilização dos testes moleculares nos países em que TB apresentava elevadas taxas de incidência e isto foi considerado um marco importante para o avanço no diagnóstico e manejo desta doença. Existem vários *Kits* comerciais utilizados e já aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, a saber, o AMTD®, Amplicor® e o EMTD® (69).

O rendimento diagnóstico dos testes comerciais é considerado variável, entretanto resultados mais fidedignos são encontrados nos casos de pacientes que apresentam resultado positivo no exame de baciloscopia. A diferença de rendimento diagnóstico dos testes *in house* e dos comerciais envolve a investigação de situações pela qual ocorreu o processo de obtenção das amostras respiratórias, estas por sua vez necessitam serem descontaminadas para que não haja a possibilidade de contaminação cruzada, assim como a verificação da qualidade técnica do exame de cultura utilizado para comparação (69).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) reconhece que os testes moleculares podem ser feitos, porém em laboratórios considerados de referência, onde haja instrumentalização adequada e pessoal qualificado (70). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2008 autorizou o uso do *Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test* (*Amplicor, Roche Diagnosis System, Inc., Bronchnurg, NJ*) e no ano seguinte, 2009, autorizou o *Xpert MTB/RIF®*. Os estados do Rio de Janeiro e Manaus foram os primeiros a utilizar este *Kit* e

até as fichas do SINAN (Sistema de informação de agravos de notificação) foram modificadas para sua implementação nos serviços públicos (71,72).

No ano de 2013 através da publicação da Portaria N° 48 do MS, o *kit Xpert MTB/RIF®* foi disponibilizado em âmbito nacional, acrescentando mais estados, como: Distrito Federal, Pernambuco, Rio Grande do Sul e São Paulo. Entretanto, esse teste ainda não é amplamente disponível (71,72).

Um grupo de pesquisadores brasileiros desenvolveu um teste molecular cuja padronização foi firmada em 2009 com uma empresa brasileira a fim de produzir um protótipo de *kit* molecular inteiramente nacional. Este *kit* foi chamado de *Detect-TB* o qual consiste na identificação de DNA com base na detecção colorimétrica de produto amplificado hibridizado utilizando sonda específica fixada em microplacas (73).

Em estudo que avaliou o uso do *Detect-TB* em amostras de escarro espontâneo e induzido nos pacientes com suspeita de TB, foram encontradas sensibilidade de 94% e especificidade de 100% nas amostras espontâneas e nas obtidas por indução do escarro, a sensibilidade foi de 85% com especificidade de 98%. Assim, este método colorimétrico mostrou especificidade semelhante ao descrito para *kits* disponíveis comercialmente e pôde proporcionar uma importante contribuição para o diagnóstico desta doença (73).

Sabe-se que a alta especificidade do PCR tem relação direta com a qualidade das amostras respiratórias que serão investigadas. No estudo de Silva BC (2010), (74) que avaliou a qualidade de amostras de escarro espontâneo para teste de PCR, foi definido que amostras de alta qualidade seriam aquelas com mais de 40% de células viáveis e menos de 25% de células epiteliais. Das 72 amostras de pacientes suspeitos de TB, 34,5% tiveram alta qualidade e destas 25% apresentaram resultado positivo no PCR, enquanto que 51,2% das amostras de baixa qualidade apresentaram 22,6% de resultados negativos no PCR. Portanto, de acordo

com este levantamento a qualidade do escarro irá influenciar no desempenho dos testes moleculares e quanto mais representativa da via aérea inferior, maior será seu rendimento para detectar moléculas de DNA (9,13).

2.1.4.5. Escarro Induzido (EI)

O diagnóstico de doenças pulmonares, meramente baseado nos aspectos clínicos, pode não ser totalmente suficiente uma vez que este grupo de doenças podem apresentar similaridades nestes achados (74). De acordo com a OMS deve ser realizada análise de escarro para a detecção do agente causador de muitas doenças respiratórias (75), a exemplo da TB.

Nos pacientes com resultado de baciloscopia negativa ou naqueles que apresentam pouca expectoração, pode ser usado o EI. A técnica de EI é não invasiva e tem a vantagem de ser de baixo custo operacional, sendo uma excelente ferramenta de investigação diagnóstica que fornece informações de eventos inflamatórios de vias aéreas respiratórias mais periféricas (75).

A indução de escarro envolve a aplicação por um tempo pré-determinado de 15 a 20 minutos de aerossóis de solução salina hipertônica de alta densidade (3% a 10%) através de nebulizador ultrassônico. Para que as névoas de aerossol sejam produzidas, um cristal piezo elétrico converte ondas de rádio em vibrações mecânicas de alta frequência e as propriedades do sinal ultrassônico é que irão determinar as características deste aerossol. Cada fabricante do equipamento determina a frequência de giro que irá estabelecer o exato tamanho das partículas a serem liberadas. A relação desta frequência com o tamanho das partículas segue

um comportamento inversamente proporcional, de maneira que uma frequência de 2,25 MHz produzirá aerossóis com diâmetro de aproximadamente 2,5 μm (76).

Uma solução hipertônica fisiologicamente pode promover alterações de pH e osmolaridade celular, que por sua vez ativa mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular facilitando a eliminação de muco principalmente de vias aéreas mais periféricas e desta maneira pode aumentar o volume do muco eliminado (77-80). Estas secreções localizadas mais periféricamente no pulmão são consideradas estéreis, porém, quando ocorre a expectoração, existe a possibilidade de mistura com outras, a exemplo saliva e resíduos alimentares e isto poderá interferir na análise desta amostra, com consequentes alterações de resultado de testes para a identificação de microrganismos causadores de doenças (80,81).

Importante considerar as recomendações em relação às questões de biossegurança para a obtenção destas amostras respiratórias, uma vez que para a aplicação da técnica de indução de escarro há a necessidade de espaço físico adequado, com sala específica que possua exaustores de pressão negativa, filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) e também alguns materiais específicos de uso individual como máscaras faciais, jalecos e óculos (82).

A aplicabilidade do EI para o diagnóstico da TB ocorre principalmente na investigação de pacientes com suspeita clínica da TB, com exames de imagens sugestivos, infectados pelo HIV, com resultados negativos na baciloscopia ou com pouca expectoração de muco (82,83,84). Vários estudos já foram publicados retratando a sua sensibilidade e especificidade diagnóstica na TB pulmonar. O primeiro estudo a ser publicado foi em 1961 (85) e seis anos depois se publicou um estudo (86) no qual 225 pacientes com suspeita da doença e oriundos do Hospital de Forças Aéreas Americanas realizaram coleta de escarro por expectoração espontânea, lavado gástrico e indução de escarro para a se estudar a eficácia destes métodos.

Daquele total de pacientes, 155 apresentaram TB ativa, com cultura positiva em 51% na indução do escarro comparada a um resultado de 30% para a técnica de lavado gástrico.

Outro estudo clássico de Yue WY et al (87) apresentou resultado de três anos de indução de escarro com diferentes substâncias inalatórias, entre elas 10% de cloreto de sódio, através de nebulizador aquecido com variação de tempo de inalação de 15 a 45 minutos em pacientes com TB com pouca ou nenhuma produção de muco. Foi demonstrado que a inalação de concentração de cloreto de sódio pôde melhorar a produção de muco e a eficiência no diagnóstico da TB em 97,4% dos casos, com poucos efeitos adversos da técnica.

Estudos posteriores compararam a eficácia da indução do escarro com outras formas mais invasivas de obtenção de amostras respiratórias. Anderson et al. (8) compararam o EI com o exame de fibrobroncoscopia com lavado broncoalveolar para o diagnóstico da TB pulmonar em 251 pacientes, em região de alta prevalência da doença e de infecção pelo HIV. Apesar de não encontrarem diferenças significativas na baciloscopia e cultura na comparação entre as técnicas, os pesquisadores concluíram que o EI foi um procedimento que demonstrou elevado rendimento diagnóstico.

Em estudo (88) realizado no Rio de Janeiro, os autores investigaram o rendimento diagnóstico da indução de escarro e da fibrobroncoscopia com lavado broncoalveolar para o diagnóstico de TB em 251 pacientes. Apesar de não encontrarem diferenças estatísticas significativas entre estas duas técnicas, este levantamento mostrou que o EI é um procedimento seguro, que pode ser utilizado como rotina principalmente em locais com menos recursos uma vez que é menos invasivo e oneroso. Já no estudo de Mc Williams *et al* (2002), o rendimento de três testes de indução de escarro foi superior em rendimento diagnóstico em relação à broncoscopia, além de apresentar custo três vezes inferior (89). Outro levantamento realizado em 101 pessoas asiladas de cinco centros de triagem na região

da Suíça identificou que amostras de EI, apesar de não melhorarem o rendimento do exame de baciloscopia, aumentaram o rendimento da positividade no exame de cultura em 46% (90).

Um estudo (65) retrospectivo realizado por pesquisadores de um Hospital Universitário no Sul do Brasil investigou a sensibilidade diagnóstica da análise bacteriológica do EI e o rendimento diagnóstico da broncoscopia feita após o resultado negativo para BAAR em amostras de EI. Dos 417 pacientes suspeitos da doença, 83 (19,9%) tiveram resultados positivos (BAAR e/ou cultura) na indução do escarro, com 83,5% das amostras consideradas adequadas para análise. E dos 39 casos diagnosticados com TB pulmonar depois de submetidos tanto à indução de escarro como à broncoscopia, 14 (35,9%) obtiveram o diagnóstico por EI e 34 (87,2%) por broncoscopia. Desta maneira, concluiu-se que embora o rendimento do EI tenha sido menor, a indicação desta técnica na abordagem inicial de pacientes com suspeita de TB que não são capazes de produzir escarro ou que tiveram resultado negativo em pesquisa de BAAR prévia é útil na prática clínica.

Outros pesquisadores na Índia também demonstraram resultados similares ao acima proposto, ao avaliarem a utilização do EI no estabelecimento do diagnóstico em pacientes com suspeita de TB, incapazes de produzir muco ou com exames de esfregaço negativo. Dos 100 casos investigados, 95% conseguiram expectorar quantidade suficiente de escarro durante a técnica, portanto demonstrando uma elevada adequação das amostras para análise e apresentando sensibilidade diagnóstica elevada de 80% e 87%, para baciloscopia e cultura, respectivamente (91).

3. JUSTIFICATIVA

A TB é um importante problema de saúde pública no mundo, particularmente em países de baixa e média renda, como no Brasil. Porto Alegre é, atualmente, a segunda capital brasileira com maior número de casos de TB, além de apresentar um elevado percentual de coinfeção TB-HIV.

Para o diagnóstico da TB, a OMS preconiza que seja utilizada inicialmente a baciloscopia de escarro. Entretanto, essa não é uma técnica sensível, e somente cerca de 60% dos novos casos de TB pulmonar têm baciloscopia positiva. Várias situações podem comprometer o resultado deste exame, dentre elas: paciente em início da doença, pacientes com pouca produção de muco e aqueles infectados pelo HIV. Dessa forma, muitas vezes o tratamento é realizado empiricamente baseado em critérios clínico-radiológicos e pode resultar em custos e toxicidades desnecessários.

A TB com baciloscopia negativa (TPBN) representa 24-30% dos casos de TB no Brasil. A mortalidade desses pacientes pode chegar até 25% em populações com alta prevalência de infecção pelo HIV, o que pode ser em grande parte consequência do atraso no diagnóstico. Além disso, embora os pacientes com baciloscopia positiva sejam considerados mais infectantes, 10-20% das transmissões de TB em nível populacional são atribuíveis a casos de TPBN.

Nos pacientes com suspeita de TB e pouca expectoração ou com baciloscopia negativa, o exame de broncoscopia, quando disponível, pode ser realizado, no entanto, é um procedimento invasivo e de maior custo. Em contraste, o EI é um procedimento não invasivo, menos dispendioso, com poucos efeitos adversos e têm mostrado acurácia diagnóstica igual ou superior a da broncoscopia no diagnóstico da TB. A cultura para micobactérias tem

rendimento diagnóstico superior ao da baciloscopia direta no EI, porém, por ser consideravelmente mais demorada em seus resultados, é menos prática na rotina diária de atendimento dos casos e para a tomada de decisão terapêutica. A técnica de PCR é a metodologia mais comum para o diagnóstico rápido da TB, todavia poucos estudos avaliaram seu papel em amostras de EI.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a acurácia diagnóstica do PCR para micobactérias no escarro induzido em pacientes com suspeita de TB pulmonar.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever características sócio-demográficas, dados clínicos, radiológicos, comorbidades, hábitos comportamentais dos pacientes com suspeita de TB;
- Avaliar sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do PCR para micobactéria no escarro induzido, utilizando como padrão ouro o exame de cultura.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Stop TB Dept., World Health Organization. Dept. of HIV/AIDS., WHO Expert Group on Smear-Negative Tuberculosis. Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents : recommendations for HIV-prevalent and resource-constrained settings. Geneva: World Health Organization; 2007. v, 36 p. p.
2. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose 2011. Available at: www.saude.gov.br.
3. Getahun H, Harrington M, O'Brien R, Nunn P. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet*. 2007;369(9578):2042-9.
4. Macpherson P, Dimairo M, Bandason T, Zezai A, Munyati SS, Butterworth AE, et al. Risk factors for mortality in smear-negative tuberculosis suspects: a cohort study in Harare, Zimbabwe. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(10):1390-6.
5. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*. 1999;353(9151):444-9.
6. Hernandez-Garduno E, Cook V, Kunitomo D, Elwood RK, Black WA, FitzGerald JM. Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. *Thorax*. 2004;59(4):286-90.
7. Tostmann A, Kik SV, Kalisvaart NA, Sebek MM, Verver S, Boeree MJ, et al. Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands. *Clin Infect Dis*. 2008;47(9):1135-42.
8. Anderson C, Inhaber N, Menzies D. Comparison of sputum induction with fiber-optic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(5 Pt 1):1570-4.
9. Breen RA, Hardy GA, Perrin FM, Lear S, Kinloch S, Smith CJ, et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis using immunology and microbiology with induced sputum in HIV-infected and uninfected individuals. *PLoS One*. 2007;2(12):e1335.

10. Maior ML, Guerra RL, Cailleaux-Cezar M, Golub JE, Conde MB. Time from symptom onset to the initiation of treatment of pulmonary tuberculosis in a city with a high incidence of the disease. *J Bras Pneumol*. 2012;38(2):202-9.
11. Parry CM, Kamoto O, Harries AD, Wirima JJ, Nyirenda CM, Nyangulu DS, et al. The use of sputum induction for establishing a diagnosis in patients with suspected pulmonary tuberculosis in Malawi. *Tuber Lung Dis*. 1995;76(1):72-6.
12. Morse M, Kessler J, Albrecht S, Kim R, Thakur R, Nthobatsang R, et al. Induced sputum improves the diagnosis of pulmonary tuberculosis in hospitalized patients in Gaborone, Botswana. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(11):1279-85.
13. Chen NH, Liu YC, Tsao TC, Wu TL, Hsieh MJ, Chuang ML, et al. Combined bronchoalveolar lavage and polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in smear-negative patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002;6(4):350-5.
14. Tueller C, Chhajed PN, Buitrago-Tellez C, Frei R, Frey M, Tamm M. Value of smear and PCR in bronchoalveolar lavage fluid in culture positive pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J*. 2005;26(5):767-72.
15. Wong CF, Yew WW, Chan CY, Au LY, Cheung SW, Cheng AF. Rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis via fiberoptic bronchoscopy: utility of polymerase chain reaction in bronchial aspirates as an adjunct to transbronchial biopsies. *Respir Med*. 1998;92(6):815-9.
16. Al Zahrani K, Al Jahdali H, Poirier L, Rene P, Menzies D. Yield of smear, culture and amplification tests from repeated sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5(9):855-60.
17. Kawada H, Toyoda E, Takahara M, Kobayashi N, Suzuki N, Suzuki T, et al. [Diagnosis of pulmonary tuberculosis by the amplicor test for *Mycobacterium tuberculosis* in induced sputum]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 1998;36(11):959-62.
18. Park JS. Efficacy of Induced Sputum for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Adults Unable to Expectorate Sputum. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2015;78(3):203-9.
19. Seong GM, Lee J, Lee JH, Kim JH, Kim M. Usefulness of sputum induction with hypertonic saline in a real clinical practice for bacteriological yields of active pulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2014;76(4):163-8.

20. Campos HS. [Tuberculosis: etiopathogenesis and clinical presentations]. Pulmão RJ. 2006;15(1):29-35.
21. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Publicações - Tuberculose. 2014 [updated 28 September 2016]; Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-oministerio/743-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/l2-a.tuberculose/11940-publicacoes-tuberculose>.
22. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. 20th ed. Geneva: World Health Organization; 2015. 192 p.
23. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. 21th ed. Geneva: World Health Organization; 2016. 216 p.
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in tuberculosis--United States, 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011;60(11):333-7.
25. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria-Executiva. Recomendações para o manejo da coinfeção TB-HIV em serviços de atenção especializada a pessoas vivendo com HIV/AIDS. 2013 [updated 28 September 2016]; Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/recomendacoes_manejo_coinfeccao_tb_hiv.pdf.
26. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2011. Geneva: World Health Organization; 2011. viii, 246 p.
27. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. 2016 [updated 28 September 2016]; Available from: www.saude.gov.br.
28. Brasil, Ministério da Saúde, Departamento de DST / Aids / Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico HIV/Aids - 2015. 2015 [28 September 2016]; Available from: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58534/boletim_aids_11_2015_web_pdf_19105.pdf.
29. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde. Saúde Brasil 2012: uma análise da situação de saúde e dos 40 anos do Programa Nacional de Imunizações. 2013 [updated 28 September 2016]; Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2012_analise_situacao_saude.pdf.

30. Costa KB, Silva CEF, Martins AF. Características Clínicas e epidemiológicas de pacientes com tuberculose na cidade com a maior incidência da doença no Brasil. 2014;34(1):40-46.
31. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. 2011 [updated 28 September 2016]; Available from: www.saude.gov.br.
32. Brasil, Rio Grande do Sul, Secretaria da Saúde. Plano Estadual de Saúde: 2012/2015. 2013 [updated 28 September 2016]; Available from: http://www.saude.rs.gov.br/upload/1382374302_PES%202012-2015%20FINAL.pdf.
33. Morse D, Brothwell DR, Ucko PJ. Tuberculosis in Ancient Egypt. *Am Rev Respir Dis.* 1964;90:524-41.
34. Campos HS. [Tuberculosis: etiopathogenesis and clinical presentations]. *Pulmão RJ.* 2006;15(1):29-35.
35. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(18):9869-74.
36. Brosch R, Gordon SV, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol.* 2000;290(2):143-52.
37. Kritski AL, Ruffino-Netto A. Health sector reform in Brazil: impact on tuberculosis control. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(7):622-6.
38. Rich AR. *The Pathogenesis of Tuberculosis.* Springfield: Charles C. Thomas; 1944. 1008 p.
39. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Beyers N, Donald PR, Starke JR. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(10):1078-90.
40. Lapa e Silva JR. [The pathogenesis of tuberculosis: novel aspects]. *Pulmão RJ.* 2012;21(1):10-4.

41. Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, et al. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med*. 1996;183(5):2293-302.
42. Lapa e Silva JR, Boechat N. The resurgence of tuberculosis and the impact of the study of pulmonary immunopathogenesis. *J Bras Pneumol*. 2004;30(4):388-94.
43. Smith JL. Can managed care do it all? *Health Syst Rev*. 1994;27(6):34-7.
44. Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, Dalcin Pde T, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2009;35(10):1018-48.
45. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. 2010 [updated 28 September 2016]; Available from: www.saude.gov.br.
46. Bastos LG, Fonseca LS, Mello FC, Ruffino-Netto A, Golub JE, Conde MB. Prevalence of pulmonary tuberculosis among respiratory symptomatic subjects in an out-patient primary health unit. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11(2):156-60.
47. Lundgren Fernando Luiz Cavalcanti, Costa Ana Maria, Figueiredo Lícia Caldas, Borba Paola Colares. Hemoptise em hospital de referência em pneumologia. *J. bras. pneumol*. [Internet]. 2010 June [cited 2016 Dec 18]; 36(3):320-324. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132010000300009&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132010000300009>.
48. Siqueira HR. Enfoque Clínico da Tuberculose Pulmonar. *Pulmão RJ*. 2012. Disponível em: [http://www.sopterj.com.br/profissionais/_revista/2012/n_01/04.pdf].
Acessado em abril de 2015.
49. Maior ML, Guerra RL, Cailleaux-Cezar M, Golub JE, Conde MB. Time from symptom onset to the initiation of treatment of pulmonary tuberculosis in a city with a high incidence of the disease. *J Bras Pneumol*. 2012;38(2):202-9.
50. Boffo MMS, Mattos IG, Ribeiro MO, Neto ICO. Tuberculosis associated to AIDS: demographic, clinical and laboratory characteristics of patients cared for at a reference center in the south of Brazil. *J Bras Pneumol* 2004;30(2):140-6.

51. Silva Rossato D, Muller AM, Dalcin Pde T. Factors associated with delayed diagnosis of tuberculosis in hospitalized patients in a high TB and HIV burden setting: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2012;12:57.
52. Aluoch JA, Swai OB, Edwards EA, Stott H, Darbyshire JH, Fox W, et al. Study of case-finding for pulmonary tuberculosis in outpatients complaining of a chronic cough at a district hospital in Kenya. *Am Rev Respir Dis.* 1984;129(6):915-20.
53. Pinto ESG, Scatolin BE, Beralto AA, Andrade RLP, Silva-Sobrinho RAS, Villa TCS. The community health agent in the detection of tuberculosis cases *Cienc Cuid Saude.* 2014;13(3):519-26
54. Barreira D, Grangeiro A. [Evaluation of tuberculosis control strategies in Brazil. Foreword]. *Rev Saude Publica.* 2007;41 Suppl 1:4-8. Avaliação das estratégias de controle da tuberculose no Brasil. Apresentação.
55. Murray CJ, Salomon JA. Expanding the WHO tuberculosis control strategy: rethinking the role of active case-finding. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2(9 Suppl 1):S9-15.
56. Oliveira M, Pina D, Giacomini G, Alvarez M, Pavan ALM, Pereira PCM. [Relationship between CT scans and serum tests for diagnosing tuberculosis]. 2010 [28 September 2016]; Available from: http://www.siscone.com.br/Uploads/CBFM/Trab01390000150320140526_000000.PDF.
57. Mello FCQ. Modelos preditivos para tuberculose pulmonar paucibacilar [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2001.
58. Burrill J, Williams CJ, Bain G, Conder G, Hine AL, Misra RR. Tuberculosis: a radiologic review. *Radiographics.* 2007; 27 (5):1255-73.
59. Mello FCQ. [Diagnostic approach to pulmonary tuberculosis]. *Pulmão RJ* 2012;21(1):27-31.
60. Assis NCS, Lopes ML, Cardoso NC, Costa MM, Sousa CdO, Lima KVB. [Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis]. *J Bras Patol Med Lab.* 2007;43(1):1-7.
61. Ferreira AAA, Queiroz KCS, Torres KP, Ferreira MAF, Accioly H, Alves MSCF. [Associated factors to pulmonary tuberculosis and sputum smear results in Natal/RN]. *Rev Bras Epidemiol.* 2005;8(2):142-9.

62. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1990;161(5):977-81.
63. Ogusku MM, Salem JI. Analysis of different primers used in the PCR method: diagnosis of tuberculosis in the state of Amazonas, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2004;30(4):433-9.
64. Hsiao CH, Lin YT, Lai CC, Chou CH, Hsueh PR. Identification of nontuberculous mycobacterial infection by IS6110 and hsp65 gene analysis on lung tissues. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(3):241-6.
65. Garcia SB, Perin C, Silveira MM, Vergani G, Menna-Barreto SS, Dalcin PTR. Bacteriological analysis of induced sputum for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in the clinical practice of a general tertiary hospital. *J Bras Pneumol*. 2009;35(11):1092-99.
66. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Lévy-Frébault V, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*. 1989;ii:1069–107.
67. Roth A, Schaberg T, Mauch H. Molecular diagnosis of tuberculosis: current clinical validity and future perspectives. *Eur Respir J*. 1997;10(8):1877-91.
68. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):175-8.
69. Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):569-76.
70. Marchi AM, Juttel ID, Kawacubo EM, Dalmarco EM, Blatt SL, Cordova CMM. Evaluation of methods for detection and identification of *Mycobacterium* species in patients suspected of having pulmonary tuberculosis. *Braz J Microbiol*. 2008;39(4):613-8.
71. World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system : policy statement. Geneva: World Health Organization; 2011. 36 p.

72. World Health Organization, Stop TB Department. - UPDATE - Implementation and roll-out of Xpert MTB/RIF. 2012 [updated 28 September 2016]; Available from: <http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Xpert%20MTB-RIF%20UPDATE%20February%202012.pdf>.
73. Michelon CT, Rosso F, Schmid KB, Sperhacke RD, Oliveira MM, Kritski AL, et al. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for Mycobacterium tuberculosis detection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(2):194-9.
74. Silva RM, Bazzo ML, Chagas M. Quality of sputum in the performance of polymerase chain reaction for diagnosis of pulmonary tuberculosis. Braz J Infect Dis. 2010;14(1):116-20.
75. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Guia de Orientações de coleta de escarro. 2014 [updated 28 September 2016]; Available from: http://www.lacen.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Manuais/Coleta_Escarro.pdf.
76. Wilkins RL, Stoller JK, Kacmarek RM. Fundamentos da Terapia Respiratória de Egan. São Paulo: Elsevier; 2011. 1408 p.
77. Jones FL, Jr. Aerosol induction of sputum. A valuable aid in pulmonary diagnosis. Postgrad Med. 1968;43(2):100-4.
78. Bell D, Leckie V, McKendrick M. The role of induced sputum in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. J Infect. 2003;47(4):317-21.
79. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. Eur Respir J Suppl. 2002;37:3s-8s.
80. Silva LCC, Hetzel JL, Felicetti JC, Moreira JdS, Camargo JJ, Porto N, et al. Pneumologia: princípios e prática. Porto Alegre: Artmed; 2012. 1024 p.
81. Skerrett SJ. Diagnostic testing for community-acquired pneumonia. Clin Chest Med. 1999;20(3):531-8.
82. Martins M, Sucupira ED, Freitas LMR, Selig L, Bethlem EP. Escarro induzido, recomendações do Programa de Controle de Tuberculose do Estado do Rio de Janeiro. J Bras Pneumol. 2004;30(6):591-2.

83. Scheicher ME, Terra Filho J, Vianna EO. Sputum induction: review of literature and proposal for a protocol. *Sao Paulo Med J.* 2003;121(5):213-9.
84. Maher D, Harries A, Getahun H. Tuberculosis and HIV interaction in sub-Saharan Africa: impact on patients and programmes; implications for policies. *Trop Med Int Health.* 2005;10(8):734-42.
85. Hensler NM, Spivey CG, Jr., Dees TM. The use of hypertonic aerosol in production of sputum for diagnosis of tuberculosis. Comparison with gastric specimens. *Dis Chest.* 1961;40:639-42.
86. Jones FL, Jr. The relative efficacy of spontaneous sputa, aerosol-induced sputa, and gastric aspirates in the bacteriologic diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Dis Chest.* 1966;50(4):403-8.
87. Yue WY, Cohen SS. Sputum induction by newer inhalation methods in patients with pulmonary tuberculosis. *Dis Chest.* 1967;51(6):614-20.
88. Conde MB, Soares SL, Mello FC, Rezende VM, Almeida LL, Reingold AL, et al. Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis: experience at an acquired immune deficiency syndrome reference center in Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(6):2238-40.
89. McWilliams T, Wells AU, Harrison AC, Lindstrom S, Cameron RJ, Foskin E. Induced sputum and bronchoscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax.* 2002;57(12):1010-4.
90. Schoch OD, Rieder P, Tueller C, Altpeter E, Zellweger JP, Rieder HL, et al. Diagnostic yield of sputum, induced sputum, and bronchoscopy after radiologic tuberculosis screening. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(1):80-6.
91. Biswas S, Das A, Sinha A, Das SK, Bairagya TD. The role of induced sputum in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Lung India.* 2013;30(3):199-202.

5. ARTIGO EM INGLÊS

5.1. DIAGNOSTIC YIELD OF PCR TEST IN INDUCED SPUTUM OF PATIENTS WITH SUSPECTED PULMONARY TUBERCULOSIS.

AUTHORS: Verônica da Silva Paiva¹, Fernanda Luiza Staub², Dirceu Felipe Valentini Jr², Regina Bones Barcellos³, Karen Barros Schmid³, Elis Regina Dalla Costa³, Maria Lucia Rosa Rossetti³, Paulo de Tarso Roth Dalcin^{1,2,4}, Denise Rossato Silva^{1,2,4}.

AFFILIATIONS:

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Faculdade de Medicina, UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do RS (CDCT/FEPPS).

⁴Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR:

Denise Rossato Silva.

Serviço de Pneumologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar – sala 2050

Porto Alegre, RS CEP 90.035-003 Fone: (51) 3359-8241

ABSTRACT

Objective: The objective of this study is to determine the diagnostic yield of PCR for TB compared with culture in IS samples. **Methods:** Prospective study. Inpatients and outpatients > 18 years with respiratory symptoms suggestive of TB were invited to participate. Subjects were interviewed using a standardized questionnaire, and collected IS. Three samples were obtained for AFB smear and culture. A fourth sample was obtained for PCR test. **Results:** A total of 116 induced sputum samples were evaluated. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of PCR were 95.2%, 48.4%, 29.0%, and 97.9%, respectively. The area under the ROC curve was 0.72 for the PCR test ($P < 0.0001$). **Conclusions:** Although the PCR specificity could be underestimated, if we consider PCR to be more sensitive than the culture method used, we thought that these PCR positive tests means false-positives. PCR results should always be interpreted carefully in conjunction with clinical information.

Keywords: Tuberculosis; Diagnosis; Induced sputum; Saline solution, hypertonic; Smear-negative tuberculosis; Molecular diagnosis.

INTRODUCTION

Smear-negative pulmonary tuberculosis (SNPT) represents 30–60% of all pulmonary tuberculosis (TB) cases, according to region ¹. In Brazil, 24–30% of cases of pulmonary TB in adults are SNPT ². The mortality of these patients can reach 25% in populations with high prevalence of HIV infection, which may be largely related to delay in diagnosis ^{3;4}. Furthermore, although smear-positive patients are considered to be more infectious, 10–20% of TB transmissions at the population level are attributable to SNPT cases ⁵⁻⁷.

In patients with smear negative sputum or no reliable sputum production, alternative methods of obtaining sputum specimens are bronchoscopy and induced sputum (IS). Bronchoscopy is an invasive procedure, expensive, and not widely available in resource-limited settings. Induced sputum is a less costly, non-invasive, and well-tolerated alternative with a similar microbiological yield of bronchoscopy ⁸⁻¹¹. Nevertheless, in settings with a high prevalence of TB-HIV, IS smears are also frequently negative and diagnosis still relies on culture. IS culture for mycobacteria increase the diagnostic yield three times more than smears alone ¹². However, culture is more time-consuming in its results—the turn-around time is about 2–8 weeks—so it is less useful to guide the clinical decision-making process ¹⁰. Thus the treatment is often carried out empirically, based on clinical criteria, and can result in unnecessary costs and toxicities.

Polymerase chain reaction (PCR) is the most common methodology for rapid diagnosis of pulmonary TB. In spontaneous sputum samples, PCR for TB provides high specificity, and the sensitivity varies from 36% to 97%, depending on the results of smears and cultures ¹³⁻¹⁵. However, few studies ¹⁶⁻¹⁹ evaluated its role in IS samples. The aim of this

study was therefore to determine the diagnostic yield of PCR for TB compared with culture in IS samples, among patients with a clinical suspicion of pulmonary TB.

METHODS

Study Design and Setting

We conducted a prospective study in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a general, tertiary care, university-affiliated hospital with 750 beds and approximately 29,000 hospitalizations/year, located in the city of Porto Alegre, in Southern Brazil. Porto Alegre has the second highest incidence of TB in the country (88.8 cases/100,000 inhabitants/year in 2015), and 25.2% of TB patients are coinfecting with HIV²⁰. The study was approved by the Ethics Committee at HCPA in March 5th, 2013 (number 13-0064).

Patients and Data Collection

Inpatients and outpatients aged > 18 years with respiratory symptoms suggestive of PTB, like productive cough for > 2 weeks, cough of any duration accompanied by constitutional symptoms (fever for at least 3 days, night sweats or weight loss of at least 3 kg in the previous month), or hemoptysis, with no sputum or with negative AFB smear on spontaneous sputum, were invited to participate. Patients with a previous diagnosis of TB and patients that already started TB treatment were excluded.

After signing informed written consent enrolled subjects were interviewed using a standardized questionnaire, and collected IS. The following data were recorded: demographic data (sex, age, race, years of schooling), presence of cough, fever, night sweating, hemoptysis, sputum production, weight loss, dyspnea, smoking status, alcohol consumption, drug use, presence of comorbidities. An independent physician analyzed the chest X-rays (CXRs) and

classified them as typical of TB (the presence of nodular, alveolar, or interstitial infiltrates predominantly affecting the zones above the clavicles or upper zones; the presence of cavitation affecting the upper zones or the apical segment of the lower lobe) or compatible with TB (enlarged hilar nodes, pneumonic lesion, atelectasis, mass lesion, miliary), according to previously described guidelines ²¹. We also evaluated hospitalization outcome (death or discharge), and outcome after discharge (cure, dropout, death). Data after discharge were obtained from SINAN's database.

IS Procedure, Microbiological and Molecular Testing

IS was performed in the sputum induction room, with a negative-pressure isolation chamber and a standardized protocol, supervised by a trained nurse. Appropriate *staff protection measures* were taken. Sputum was induced through inhalation of 5% hypertonic saline solution produced by an ultrasonic nebulizer (RespiraMax®, NS, São Paulo, Brazil). The procedure was continued until an adequate amount of sputum sample was collected or 20 min has passed.

Three samples were obtained for AFB smear (Ziehl-Neelsen method) and culture (Lowenstein-Jensen medium). A fourth sample was obtained for PCR test. Laboratory technicians who conducted the molecular testing were blinded to the bacteriology results. Detect-TB (Labtest, MG, Brazil) is a new molecular commercial kit that has been developed in Brazil, based on colorimetric detection of amplified product of the IS6110 region hybridized with specific probe fixed on microplate. DNA extraction, purification and amplification were performed as described previously ²². To prevent DNA contamination, strict room separation was used, including a workflow from initiation of the PCR to

hybridization. Briefly, *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) DNA was amplified using biotinylated primers targeting the IS6110 fragment. These amplified products were reverse hybridized on microcell plates (Nunc Immobilizer™ Amino Surface, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) to a fixed aminated probe complementary to the internal region of the amplified IS6110 fragment. The hybridization signal was detected by colorimetry using the streptavidin-peroxidase/TMB system and measured using a spectrophotometer with a 450/620 nm filter. The absorbance of the negative control was subtracted from the results, as recommended by Detect-TB (Nunc Tech Note, 1999a, Nunc Tech Note, 1999b). All samples with readings above 0.275 were considered positive for MTBC DNA ²².

Statistical Analysis

Data analysis was performed using SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois) and MedCalc 16.4.3 software package (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Data were presented as number of cases, mean \pm standard deviation (SD), or median with interquartile range (IQR). Positive mycobacterial culture results were defined as a gold standard of the diagnosis. On the basis of culture results, we calculated the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value with 95% CIs of the PCR for the detection of MTBC. We constructed receiver operating characteristic (ROC) curves for PCR. Considering the sensitivity of the DetectTB test of 85% ²³, with a confidence interval of 95% and a power of 80%, it will be necessary to include at least 100 patients in the study.

RESULTS

During the study period, 126 patients met the inclusion criteria and were invited to participate. Ten patients could not expectorate sputum after hypertonic saline inhalation, and were excluded from analysis. A total of 116 induced sputum samples were evaluated. The characteristics of the study population are shown in Table 1.

Table 1. Characteristics of study patients.

Characteristics	n=116*
Demographic characteristics	
Age, yr	50.8 ± 16.2
Male sex	53 (45.7)
White race	85 (73.3)
< 8 years of schooling	74 (63.8)
Current smokers	53 (45.7)
Never smokers	49 (42.2)
Former smokers	14 (12.1)
Alcoholism	39 (33.6)
Drug use	20 (17.2)
Symptoms	
Cough	110 (94.8)
Weight loss	79 (68.1)
Dyspnea	71 (61.2)
Fever	60 (51.7)
Night sweats	52 (44.8)
Comorbidities	
HIV positive	35 (30.2)
Lung diseases	22 (19.0)
Neoplasia	13 (11.2)
Diabetes mellitus	5 (4.3)
Radiographic patterns	
Typical of TB	61 (52.6)
Compatible with TB	35 (30.2)
Atypical of TB	20 (17.2)
Outpatients	78 (67.2)
Induced sputum AFB smear positive	9 (7.8)
Induced sputum culture positive	21 (18.1)
Induced sputum PCR positive	69 (59.5)

*Data are presented as mean \pm SD, n/N (%): number of cases with characteristic/total number of cases (percentage), or median (interquartile range). HIV: human immunodeficiency virus; TB: tuberculosis; AFB: acid-fast bacilli; PCR: polymerase chain reaction.

The mean age of all patients was 50.8 ± 16.2 years, 45.7% were males, and 73.3% were white. Thirty-five patients (30.2%) were HIV positive. The most common symptoms were cough (94.8%), weight loss (68.1%), and dyspnea (61.2%). The radiographic patterns were classified as typical of TB, compatible of TB, and atypical of TB in 61 (52.6%), 35 (30.2%), and 20 (17.2%) patients, respectively. Thirty eight (32.8%) inpatients and 78 (67.2%) outpatients were included in the study.

Thirty-three patients (28.4%) were able to collect spontaneous sputum samples, and all of them were AFB and culture negatives. Induced sputum AFB smear and culture were positives in 9 (7.8%) and 21 (18.1%) patients, respectively. PCR was positive in 69 (59.5%) of induced sputum samples. Ninety seven (83.6%) patients had a clinical TB diagnosis. The outcomes were cure (n=44), dropout (n=36), death (n=15), and drug-resistant TB (n=2).

Of the 116 analyzed samples, considering the culture as the gold standard, 21 samples were defined as TB cases and 95 non-TB cases. Among the 21 samples that were culture positive, only one was PCR negative. All samples that were culture negative were smear negative. Among the 95 culture negative samples, 49 (51.6%) were PCR positive and 46 (48.4%) PCR negative. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of PCR were 95.2% (95% CI 76.2-99.9), 48.4% (95% CI 38.0-58.9), 29.0% (95% CI 18.7-41.2), and 97.9% (95% CI 88.7-99.9), respectively. The area under the ROC curve was 0.72 for the PCR test (95% CI 0.63 to 0.79; $P < 0.0001$) (Figure 1).

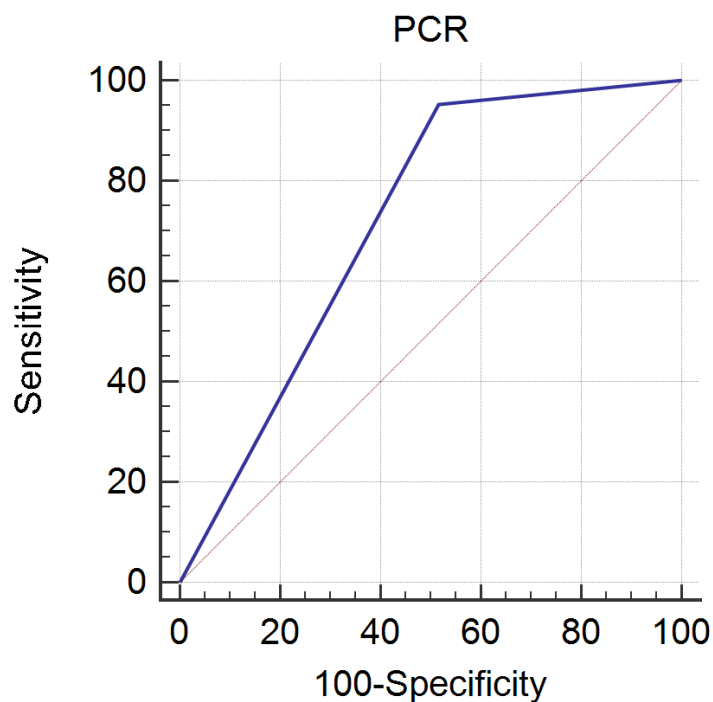


Figure 1. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve for the Detection of Tuberculosis with PCR test (The area under the ROC curve was 0.72 for the PCR test [95% CI 0.63 to 0.79; $P < 0.0001$]).

Among the 49 PCR positive/culture negative samples, 43 (87.8%) had a clinical diagnosis of TB and were treated with anti-TB drugs. The outcomes of these patients were: cure (n=18), dropout (n=16), death (n=8), and drug-resistant TB (n=1).

DISCUSSION

In the present study, we evaluated the accuracy of a PCR test (Detect-TB) in IS of outpatients and inpatients with a clinical suspicion of TB in the routine assessment carried out at a tertiary hospital. The overall PCR sensitivity and specificity for 116 specimens were 95.2% and 48.4%, respectively, with a positive predictive value of 29.0% and a negative predictive value of 97.9%.

IS is proved to be useful in smear negative pulmonary TB or in patients unable to expectorate, increasing TB case detection rates²⁴. Nevertheless, IS smear microscopy lacks sensitivity^{12;25} and, although mycobacterial culture increases diagnostic yield, its results are too slow for clinical practice usefulness. In this context, rapid diagnosis of TB relies on PCR test. Few studies¹⁶⁻¹⁹ evaluated the PCR role in IS samples for TB diagnosis, and most of them had small sample sizes and were not designed to evaluate the sensitivity and specificity of the test¹⁷⁻¹⁹. Kawada et al¹⁷ compared the PCR with the conventional smear and culture method for the detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in only 25 IS samples from patients suspected of active pulmonary TB. IS were both PCR and culture positive in 10 patients, PCR positive and culture negative in 4 patients, and PCR negative and culture positive in 2 patients. In another study¹⁹, the role of IS in patients with spontaneous expectoration was investigated. Only 38 patients were evaluated, and PCR was positive in 9, including cases of nontuberculous mycobacteria. A retrospective study¹⁸ from South Korea also reported the findings of 39 IS samples from pulmonary TB patients. Thirty-one patients were culture positive. Twenty-four IS specimens were tested for PCR and 13 (54.2%) were positive. The largest study¹⁶ that evaluated PCR in IS was developed to assess the yield of repeated sputum induction for the diagnosis of active TB in patients who do not produce

spontaneous sputum, or with smear negative spontaneous samples. The authors found that PCR specificity was 100%, but in smear negative/culture positive patients, the sensitivity was only 47%. In addition, one concern about this study is that almost 30% of active TB cases in this study were clinically diagnosed, and clinical assessment is not always reliable to be used as the gold standard in a comparison study. Another study²³ that evaluated the same PCR test (Detect-TB), and demonstrated high sensitivity and specificity, also used clinical outcome as the gold standard.

In our study, we found a very low specificity for PCR test. There are some possible explanations for this finding, like previous TB history, cross-contamination of specimens, and low sensitivity of culture. False-positive cases due to previous TB were not a problem, since we excluded these patients. Intra- and pre-laboratory contamination of specimens with DNA from previous PCRs or during DNA extraction could be the cause of false positive results²⁶. Although we used an unidirectional workflow in order to prevent DNA and amplicon contamination, it is very unlikely but possible that a contamination could have occurred, especially during the pre-analytical phase, at the samples collection site. Another reason for this observation could be that the sensitivity of the culture system used in our institution is lower than PCR, as reported previously²⁶⁻²⁹. Also, when culture is used as the gold standard test, specimens containing noncultivable organisms may lead to a positive PCR and be considered as false-positive result^{30;31}. In order to support the hypothesis that PCR is more sensitive than culture, it would be useful to have two or more positive PCR results in patients with negative cultures^{29;32}, but we collected only one sample per patient for PCR test in our study. Al Zahrani et al¹⁶ demonstrated that the yield of PCR test increased with the greater number of IS samples evaluated. However, when we considered the clinical diagnosis together with PCR/culture results, we found that almost 90% of patients with PCR

positive/culture negative samples had a clinical diagnosis of TB and were treated with anti-TB drugs, supporting the hypothesis that PCR is more sensitive than culture.

In conclusion, in this study we found a high sensitivity and a low specificity of a PCR test in patients with a clinical suspicion of pulmonary TB. Although the PCR specificity could be underestimated, if we consider that PCR to be more sensitive than the culture method used, we thought that these PCR positive tests in culture negative patients actually means false-positive results. It demonstrates that PCR results should always be interpreted carefully in conjunction with clinical information.

REFERENCES

- (1) World Health Organization. Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents. Recommendations for HIV prevalent and resource-constrained settings. 2007. Available at: www.who.int.
- (2) Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose 2011. Available at: www.saude.gov.br.
- (3) Getahun H, Harrington M, O'Brien R et al. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet* 2007; 369(9578):2042-2049.
- (4) Macpherson P, Dimairo M, Bandason T et al. Risk factors for mortality in smear-negative tuberculosis suspects: a cohort study in Harare, Zimbabwe. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15(10):1390-1396.
- (5) Behr MA, Warren SA, Salamon H et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999; 353(9151):444-449.
- (6) Hernandez-Garduno E, Cook V, Kunimoto D et al. Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. *Thorax* 2004; 59(4):286-290.
- (7) Tostmann A, Kik SV, Kalisvaart NA et al. Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands. *Clin Infect Dis* 2008; 47(9):1135-1142.

- (8) Anderson C, Inhaber N, Menzies D. Comparison of sputum induction with fiber-optic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(5 Pt 1):1570-1574.
- (9) Breen RA, Hardy GA, Perrin FM et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis using immunology and microbiology with induced sputum in HIV-infected and uninfected individuals. *PLoS One* 2007; 2(12):e1335.
- (10) Conde MB, Melo FA, Marques AM et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol* 2009; 35(10):1018-1048.
- (11) Parry CM, Kamoto O, Harries AD et al. The use of sputum induction for establishing a diagnosis in patients with suspected pulmonary tuberculosis in Malawi. *Tuber Lung Dis* 1995; 76(1):72-76.
- (12) Morse M, Kessler J, Albrecht S et al. Induced sputum improves the diagnosis of pulmonary tuberculosis in hospitalized patients in Gaborone, Botswana. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12(11):1279-1285.
- (13) Chen NH, Liu YC, Tsao TC et al. Combined bronchoalveolar lavage and polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in smear-negative patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6(4):350-355.
- (14) Tueller C, Chhajed PN, Buitrago-Tellez C et al. Value of smear and PCR in bronchoalveolar lavage fluid in culture positive pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* 2005; 26(5):767-772.
- (15) Wong CF, Yew WW, Chan CY et al. Rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis via fibreoptic bronchoscopy: utility of polymerase chain reaction in bronchial aspirates as an adjunct to transbronchial biopsies. *Respir Med* 1998; 92(6):815-819.

- (16) Al ZK, Al JH, Poirier L, Rene P, Menzies D. Yield of smear, culture and amplification tests from repeated sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001 Sep;5(9):855-60.
- (17) Kawada H, Toyoda E, Takahara M et al. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by the amplicor test for *Mycobacterium tuberculosis* in induced sputum. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 1998; 36(11):959-962.
- (18) Park JS. Efficacy of Induced Sputum for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Adults Unable to Expectorate Sputum. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2015; 78(3):203-209.
- (19) Seong GM, Lee J, Lee JH et al. Usefulness of sputum induction with hypertonic saline in a real clinical practice for bacteriological yields of active pulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2014; 76(4):163-168.
- (20) Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. 2016. Available at: www.saude.gov.br.
- (21) 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.
- (22) Michelon CT, Rosso F, Schmid KB et al. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(2):194-199.

- (23) Schmid KB, Scherer L, Barcellos RB et al. Smear plus Detect-TB for a sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis: a cost-effectiveness analysis in an incarcerated population. *BMC Infect Dis* 2014; 14:678.
- (24) Hepple P, Ford N, McNerney R. Microscopy compared to culture for the diagnosis of tuberculosis in induced sputum samples: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16(5):579-588.
- (25) McWilliams T, Wells AU, Harrison AC et al. Induced sputum and bronchoscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2002; 57(12):1010-1014.
- (26) Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2):277-284.
- (27) Bennedsen J, Thomsen VO, Pfyffer GE et al. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34(6):1407-1411.
- (28) Devallois A, Legrand E, Rastogi N. Evaluation of Amplicor MTB test as adjunct to smears and culture for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in the French Caribbean. *J Clin Microbiol* 1996; 34(5):1065-1068.
- (29) Kivihya-Ndugga L, van CM, Juma E 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.
- (30) Forbes BA, Hicks KE. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31(7):1688-1694.

- (31) Jonas V, Alden MJ, Curry JI et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31(9):2410-2416.
- (32) Kuo AJ, Chiu CH, Wu JL, Greenberg D. Clinical evaluation of PCR for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with respiratory specimens that were smear positive but culture negative for *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infec* 1999; 5:702-703.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, neste estudo encontramos uma alta sensibilidade e baixa especificidade do teste de PCR em amostras de EI de pacientes com suspeita clínica de TB pulmonar. Embora a especificidade da PCR possa ser subestimada, se considerarmos que a PCR é mais sensível do que o método de cultura utilizado, pensamos que esses testes positivos para a PCR em pacientes com cultura negativa realmente significam resultados falso-positivos. Este estudo demonstra que os resultados de PCR devem ser sempre interpretados cuidadosamente em conjunto com as informações clínicas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, avaliamos a acurácia de um teste de PCR (Detect-TB) em amostras de EI de pacientes ambulatoriais e internados com suspeita clínica de TB pulmonar, na avaliação de rotina realizada em hospital terciário. A sensibilidade e especificidade da PCR para 116 espécimes foram de 95,2% e 48,4%, respectivamente, com valor preditivo positivo de 29,0% e valor preditivo negativo de 97,9%. Há algumas possíveis explicações para a baixa especificidade do exame de PCR encontrada nesse estudo, conforme discutido anteriormente. Estudos futuros com um novo delineamento, utilizando um padrão-áureo diferente, como um painel de revisores consistindo de médicos experientes no diagnóstico da TB e especialistas de laboratório, devem ser realizados para confirmar esses achados.