

Análise de diferentes *primers* utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no Estado do Amazonas*

Analysis of different *primers* used in the PCR method: diagnosis of tuberculosis in the state of Amazonas, Brazil

MAURICIO MORISHI OGUSKU, JULIA IGNEZ SALEM

Introdução: Há diferentes *primers* sendo testados para a detecção do DNA do *Mycobacterium tuberculosis*. A acuidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) depende da existência da seqüência alvo no bacilo e de os testes serem realizados em cepas isoladas ou em amostras clínicas.

Objetivo: Verificar a presença das seqüências de DNA alvo mais relatadas na literatura para o diagnóstico da tuberculose em amostras clínicas usando como controle positivo as respectivas cepas de *M. tuberculosis* isoladas.

Método: Oitenta e uma amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose foram submetidas à baciloscopia e cultivo. A técnica de PCR foi realizada nas amostras clínicas e cepas isoladas com *primers* específicos para os seguintes alvos: IS6110, 65 kDa, 38 kDa e MPB64.

Resultados: Em 24 amostras com baciloscopia e cultivo negativos, a PCR também foi negativa com todos os *primers* testados. Em 19 amostras com baciloscopia positiva e nas cepas isoladas obteve-se 100% de resultados positivos nas PCR, exceto nas PCR em amostras clínicas com os *primers* para a seqüência MPB64 (89,4%). Em 38 amostras com baciloscopia negativa e cultivo positivo, as PCR tiveram resultados variáveis, sendo que os *primers* específicos que amplificam o fragmento de 123 pb da seqüência IS6110 foram os que forneceram os maiores percentuais de positividade (92,1%), concordância diagnóstica (0,9143), co-positividade (94,7%) e co-negatividade (100%).

Conclusão: As seqüências IS6110, 38 kDa, MPB64 e 65 kDa foram encontradas no genoma de todas as cepas de *M. tuberculosis* isoladas desses pacientes do Estado do Amazonas. O protocolo utilizado no processamento das amostras clínicas e os *primers* específicos utilizados para amplificação do fragmento de 123 pb da seqüência IS6110 demonstraram maior eficiência no diagnóstico da tuberculose pulmonar (paucibacilar) em comparação com a literatura.

J Bras Pneumol 2004; 30(4) 433-9

Background: Various *primers* are being tested for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. The accuracy of the polymerase chain reaction (PCR) depends on the target sequence used and whether the test will be performed in culture or in clinical specimens.

Objectives: To identify DNA sequences, specifically those commonly reported as targets for diagnosis of tuberculosis (TB), in clinical samples of *M. tuberculosis* strains.

Method: Eighty-one clinical samples from suspected TB patients were initially processed and submitted to bacilloscopy (smear) and culture, and PCR was performed with specific *primers* for the following targets: IS6110, 65 kDa, 38 kDa and MPB64.

Results: Smear and culture results were negative in 24 samples, as was the PCR. The 19 samples testing smear positive, as well as the isolated strains, were 100% positive on PCR, with the exception of the 89.4% result from PCR with MPB64 primers. In the 38 smear negative and culture positive samples, PCR results were inconsistent. The *primers* specific for amplifying the 123 bp IS6110 fragment gave the highest positivity (92.1%), diagnostic agreement (0.9143), co-positivity (94.7%) and co-negativity (100%).

Conclusion: The IS6110, 38 kDa, MPB64 and 65 kDa sequences were found in the genome of all *M. tuberculosis* strains isolated in patients from the state of Amazonas. The protocol for processing the clinical samples prior to PCR analysis and the specific primers used to amplify the 123bp IS6110 fragment showed a greater efficiency in diagnosing pulmonary (paucibacillary) tuberculosis in comparison to published data.

Descritores: *Primers*/PCR. Diagnóstico/Tuberculose. *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words: *Primers*/PCR. Diagnosis/Tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis*.

*Trabalho realizado no Laboratório de Micobacteriologia da Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.

Órgãos Financiadores: Ministério da Saúde, CAPES/RENOR.

Endereço para correspondência: Maurício Morishi Ogusku. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo, 2936 - Bairro do Aleixo. CEP 69060-001 - Manaus, AM - Tel: 55 92 643 3058. E-mail: mmogusku@inpa.gov.br

Recebido para publicação, em 5/3/04. Aprovado, após revisão, em 3/6/04.

INTRODUÇÃO

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular cuja escolha do DNA alvo e definição dos primers dentro da seqüência do DNA são fatores determinantes na sua acuidade. Ela vem sendo utilizada como alternativa de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas. Entretanto, a sua aplicação na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* tem apresentado resultados variáveis, principalmente em relação à sensibilidade do teste^(1,2,3). Por essa razão várias seqüências alvo têm sido utilizadas, tais como: IS6110, 65 kDa (GroEL), 38 kDa (PhoS, CIE Ag78 ou Pab) e MPB64 (23 kDa). Dentre essas, a IS6110 é a mais comumente usada por ser uma seqüência repetitiva no genoma do *M. tuberculosis*. Essa característica propicia um aumento na sensibilidade da PCR, quando comparada com a amplificação de seqüências únicas no DNA⁽⁴⁾. Entretanto, vale ressaltar que a seqüência IS6110 já foi relatada como ausente em cepa de *M. tuberculosis* isolada na Índia⁽⁵⁾, bem como foram detectadas seqüências homólogas em cepas de micobactérias potencialmente patogênicas, tais como *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense* e *M. chelonae*^(6,7). No Brasil não há relato de cepas de *M. tuberculosis* sem a IS6110 e no Estado do Amazonas é comum o isolamento de algumas das espécies citadas^(8,9,10).

Diante desses fatos, a aplicação da PCR no diagnóstico da tuberculose (Tb) no estado do Amazonas induziu aos seguintes questionamentos: as seqüências publicadas na literatura existiriam em cepas de *M. tuberculosis* existentes no Estado do Amazonas? Quais seriam os primers mais indicados para a aplicação desta técnica em amostras clínicas nesse estado?

Visando a responder a essas questões, foi investigada a presença das seqüências alvo mais divulgadas na literatura em um painel de cepas de *M. tuberculosis* e nas amostras clínicas de onde foram originalmente isoladas.

MÉTODO

Foram analisadas 81 amostras clínicas, encaminhadas ao Laboratório de Micobacteriologia do INPA, oriundas de 81 diferentes pacientes residentes no Estado do Amazonas com suspeita de Tb. Submetidas à baciloscopia para pesquisa

Siglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho:

BAAR - Bacilos álcool-ácidos resistentes
K - Índice Kappa
Nested-PCR - Protocolo de reamplificação do produto de PCR
PB - Pares de base
PCR - Reação em cadeia da polimerase
RFLP - Restriction fragment length polymorphism
Tb - Tuberculose

de BAAR e ao cultivo para o isolamento do *M. tuberculosis*, 24 tiveram resultados negativos em ambos os exames, 19 foram positivas em ambos os exames (amostras multibacilares) e 38 foram negativas na baciloscopia com cultivo positivo para o *M. tuberculosis* (amostras paucibacilares).

As baciloskopias foram realizadas conforme orientações do Ministério da Saúde⁽¹¹⁾. Para o cultivo, as amostras foram transferidas para tubos cônicos graduados de centrífuga com capacidade de 15 mL, com adição de volume igual de NaOH a 4%, agitadas, e deixadas em repouso por 15 minutos. Foi completado o volume para 12 mL com água destilada estéril, e foram centrifugadas a 3.000 x g e desprezado o sobrenadante. Os sedimentos foram suspensos em 2 mL de água destilada estéril, neutralizados com HCl a 4%, e foram retiradas alíquotas de 0,2 mL para semeadura em 3 tubos contendo meio de Lowenstein-Jensen. O restante da suspensão foi reservado para posterior análise pela PCR e os tubos semeados foram incubados a 37°C pelo período máximo de 60 dias. As cepas de micobactérias isoladas foram identificadas como *M. tuberculosis* conforme recomendado por David et al.⁽¹²⁾.

Tanto a suspensão das amostras clínicas como as 57 cepas isoladas das respectivas amostras foram analisadas pela PCR visando a identificar as seqüências alvo IS6110, 65 kDa, 38 kDa e MPB64. Para a detecção da região IS6110 foram testados dois pares distintos de primers, um que promove a amplificação de um fragmento de 123 pb⁽⁴⁾ e outro de 541 pb⁽¹³⁾. As amplificações das seqüências nucleotídicas dos alvos 65 kDa e 38 kDa consistiram em duas PCRs consecutivas, PCR e protocolo de reamplificação do produto de PCR (Nested-PCR), com uso de dois pares de primers específicos para cada teste. Na PCR para o alvo 65 kDa⁽¹⁴⁾, o par de primers externos amplificou uma região de 383 pb, enquanto o produto da Nested-PCR, com os primers internos, resultou em um fragmento de 155 pb. Na PCR para o alvo 38 kDa

⁽¹⁵⁾, os produtos amplificados na PCR simples e *Nested-PCR* forneceram fragmentos de 419 pb e 322 pb, respectivamente. Os *primers* para a região MPB64 ⁽¹⁶⁾ amplificaram um fragmento de 240 pb.

A extração do DNA dos sedimentos das amostras foi realizada conforme protocolo de Ogusku *et al.* ⁽¹⁷⁾ e os DNA foram purificados com fenol-clorofórmio e precipitados com etanol absoluto, conforme Davis *et al.* ⁽¹⁸⁾. Para a extração dos DNA das 57 cepas de *M. tuberculosis* isoladas das amostras submetidas ao cultivo, utilizou-se protocolo adaptado de Perosio *et al.* ⁽¹⁹⁾, em que aproximadamente 1 mg de cada cepa foi transferido para um tubo com tampa de rosca contendo pérolas de vidro, submetido à agitação em vórtex para desagregação bacilar e acrescido de água destilada estéril até a obtenção de uma suspensão com turbidez equivalente à escala nº 1 de McFarland. De cada suspensão, utilizou-se uma alíquota de 50 µL para extração do DNA. Em cada alíquota foram adicionados 50 µL de tampão de lise (200 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 800 µg/mL de Proteinase K). As alíquotas foram incubadas a 37°C *overnight* e posteriormente a 100 °C por 10 minutos, e centrifugadas a 14.000 x g por 15 segundos. Cinco microlitros do sobrenadante foram utilizados para a realização da PCR com os diferentes *primers*.

Visando a estabelecer a concentração mínima de bacilos que poderia ser detectada pela PCR com os diferentes *primers*, verificou-se a sensibilidade intrínseca dos mesmos conforme protocolo de Bollela *et al.* ⁽²⁰⁾. Para tanto, uma suspensão de *M. tuberculosis* H37Rv foi preparada com turbidez igual à do tubo 1 da escala de McFarland (equivalente a 3 x 10⁸ bacilos/mL), e diluída a 1:10 em água destilada estéril, sucessivamente, até a concentração de 3 x 10⁻¹ bacilos/mL. Para a extração do DNA submeteu-se cada diluição a 100°C por 10 minutos e centrifugação a 13.500 rpm por 10 minutos. Cinco microlitros do sobrenadante foram então utilizados na PCR. A especificidade intrínseca dos *primers* foi verificada frente aos DNA de *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para extração do DNA dessas espécies, foi utilizado o mesmo protocolo anterior.

A PCR para cada seqüência alvo nos DNA

extraídos das amostras clínicas e das cepas foi realizada em um volume de 50 µL contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 0,01% gelatina; 2 mM MgCl₂; 200 µM dNTP (Sigma); 0,1µM de cada *primer*; 2U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen); e 5 µL do DNA extraído (cepa isolada ou amostra clínica ou produto de PCR). As seqüências dos *primers* para os respectivos DNA alvos e os parâmetros de amplificação estão descritos na Tabela 1. Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen e o termociclador utilizado foi o GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Para cada sessão de amplificação de DNA, foi incorporado um controle positivo contendo DNA de *M. tuberculosis* H37Rv e uma reação sem DNA (controle negativo).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Posteriormente, o gel de agarose foi corado com brometo de etídeo e os produtos de PCR visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Eagle Eye® II (Stratagene).

Para a análise dos resultados utilizou-se o índice de Kappa na verificação de concordância entre métodos diagnósticos (cultivo e PCR) e entre os diferentes *primers*. Para a análise de co-positividade e co-negatividade foram utilizadas tabelas 2 X 2.

RESULTADOS

As sensibilidades intrínsecas dos *primers* testados alcançaram a diluição de 3 x 10⁰, ou seja, 3 bacilos/mL, exceção feita aos *primers* para MPB64, que apresentaram menor sensibilidade, pois somente tiveram positividade na diluição de 3 x 10² bacilos/mL. As especificidades foram consideradas altas por não ter ocorrido amplificação a partir de DNA de *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

As PCR realizadas nos sedimentos das amostras clínicas negativas nos exames bacteriológicos de baciloscopia e cultivo tiveram também resultados negativos com todos os *primers* testados. Por outro lado, todas as amostras clínicas positivas nos exames baciloscópicos e as cepas isoladas das mesmas tiveram 100% de resultados positivos na PCR, com exceção das realizadas nas amostras clínicas com os *primers* para a seqüência MPB64

TABELA 1
 Seqüências dos *primers* e parâmetros da PCR

Alvos	Seqüências dos <i>primers</i>	Produto Amplificado	Ciclos
IS6110	5'- CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG - 3'	123 pb	94°C - 1 min
	5'- CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG - 3'		66°C - 1 min 35 72°C - 1 min
IS6110	5'- GTG CGG ATG GTC GCA GAG AT - 3'	541 pb	94°C - 1 min
	5'- CTC GAT GCC CTC ACG GTT CA - 3'		65°C - 1 min 35 72°C - 1 min
38 kDa	Externos:	419 pb	94°C - 1 min
	5'- ACC ACC GAG CGG TTC GCC TGA - 3' 5'- GAT CTG CGG GTC GTC CCA GGT - 3'		63°C - 1 min 35 72°C - 1 min
38 kDa	Internos:	322 pb	94°C - 1 min
	5'- TGA CGT TGG CGG AGA CCG - 3' 5'- ATG GTG CCC TGG TAC ATG - 3'		63°C - 1 min 35 72°C - 1 min
65 kDa	Externos:	383 pb	94°C - 1 min
	5'- GAG ATC GAG CTG GAG GAT CC - 3' 5'- AGC TGC AGC CCA AAA GGT GTT - 3'		60°C - 1 min 35 72°C - 1 min
65 kDa	Internos:	155 pb	94°C - 1 min
	5'- CCA TCG ATC CGA GAC CCT GCT CAA GGG C - 3' 5'- TGC TCT AGA CTC CTC GAC GGT GAT GAC G - 3'		60°C - 1 min 35 72°C - 1 min
MPB64	5'- TCC GCT GCC AGT CGT CTT CC - 3'	240 pb	94°C - 1 min
	5'- GTC CTC GCG AGT CTA GGC CA - 3'		50°C - 1 min 35 72°C - 1 min

(89,4%). Os resultados das PCR nas amostras com resultados baciloscópicos negativos para BAAR e nas cepas oriundas das mesmas foram variáveis conforme os *primers* testados. Os percentuais de positividade obtidos para essas amostras estão demonstrados na Figura 1.

Os resultados da análise de concordância entre o diagnóstico de Tb proporcionado pelo cultivo e o obtido pela PCR, conforme os diferentes *primers* estudados, assim como os de co-positividade e co-negatividade, ambos tendo como padrão diagnóstico o isolamento de *M. tuberculosis*, estão demonstrados na Tabela 2.

A concordância de diagnósticos de Tb pela PCR com os diferentes *primers* estudados, assim como os de co-positividade e co-negatividade, ambos tendo como padrão diagnóstico o *primer* IS6110, por ter sido o que proporcionou maior percentual de positividade, estão demonstrados na Tabela 3.

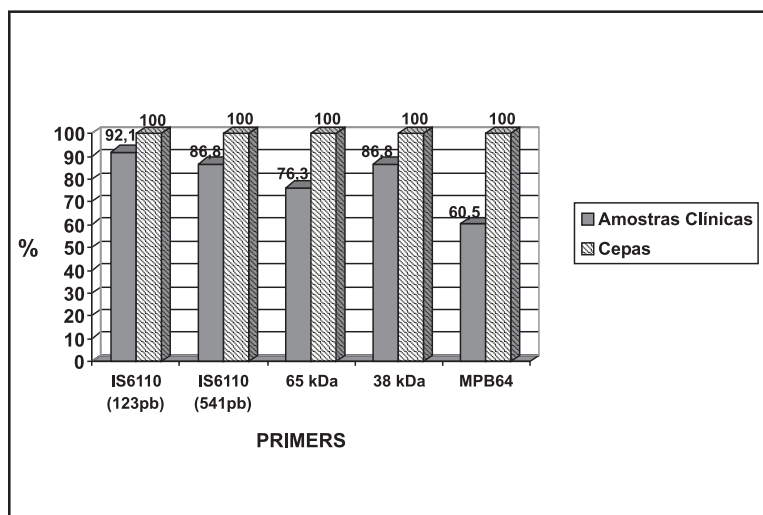


Figura 1. Percentuais de positividade da PCR conforme *primers* utilizados em amostras clínicas paucibacilares e cepas de *M. tuberculosis*

DISCUSSÃO

Os resultados sugerem que as seqüências alvo IS6110, 65 kDa, 38 kDa e MPB64 estão preservadas em todas as cepas analisadas e que os respectivos primers estudados poderiam ser utilizados no diagnóstico de Tb por PCR em amostras clínicas. Nas amostras clínicas multibacilares apenas os primers para a seqüência MPB64 (240 pb) não foram 100% eficazes, amplificando 89,4% delas. Entre as amostras paucibacilares os percentuais de positividade foram variados com os primers estudados, conforme demonstrado na Figura 1.

O percentual de positividade para amplificação do fragmento de 123pb do alvo IS6110, obtido no presente trabalho (92,1%), foi superior aos encontrados por Nolte *et al.* ⁽²¹⁾, Shavar *et al.* ⁽²²⁾ e

por Montenegro *et al.* ⁽²⁾, que obtiveram os percentuais de 57,0%, 53,0% e 76,7%, respectivamente. Quando foram utilizados os primers que amplificam um fragmento de 541 pb do alvo IS6110, obteve-se percentual de positividade de 86,8%. Nossos resultados são superiores aos encontrados por Abe *et al.* ⁽¹³⁾, que obtiveram apenas 50,0% com os referidos primers. Com os primers 65 kDa, após a *Nested-PCR* (65 kDa - 155 pb), obteve-se percentual de positividade em 76,3%, resultado superior ao de Pierre *et al.* ⁽¹⁴⁾, que obtiveram apenas 40%. Em relação aos primers para a seqüência 38 kDa, nosso percentual de positividade da *Nested-PCR* foi de 86,8%, superior aos 38,4% encontrado por Miyazaki *et al.* ⁽¹⁵⁾. A PCR para MPB64 foi a que apresentou o

TABELA 2
Resultados de concordância e acuidade da PCR com diferentes primers em relação ao cultivo em LJ

Amostras	PCR										
	IS6110 (123 pb)		IS6110 (541 pb)		65 kDa		38 kDa		MPB64		
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	
Cultivo para <i>M. tuberculosis</i>	Pos	54	03	52	05	48	09	52	05	32	25
	Neg	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24
Total		81		81		81		81		81	
Concordância Observada		96,3%		93,8%		88,9%		93,8%		69,1%	
Concordância Esperada		56,8%		55,8%		53,7%		55,8%		45,7%	
Índice Kappa (K)		0,9143		0,8604		0,7596		0,8604		0,4313	
Interpretação (K)		Ótima		Ótima		Boa		Ótima		Regular	
Co-positividade		94,7%		91,2%		84,2%		91,2%		56,1%	
Co-negatividade		100%		100%		100%		100%		100%	

PCR: reação em cadeia da polimerase; Pos: Positivo; Neg: Negativo; LJ: meio de Lowenstein-Jensen.

TABELA 3
Resultados de concordância e acuidade entre as ampliações de DNA com diferentes primers em relação aos primers IS6110 (123 pb)

Primers	IS6110 (123 pb)								
	IS6110 (541 pb)		65 kDa		38 kDa		MPB64		
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	
IS6110(123 pb)	Pos	51	03	47	7	51	3	32	22
	Neg	01	26	01	26	01	26	0	27
Total		81		81		81		81	
Concordância Observada		95,0%		90,1%		95,0%		72,8	
Concordância Esperada		54,7%		53,1%		54,7%		46,5%	
Índice Kappa (K)		0,8909		0,7895		0,8909		0,4923	
Interpretação (K)		Ótima		Boa		Ótima		Regular	
Co-positividade		94,4%		82,4%		94,4%		59,2%	
Co-negatividade		96,3%		96,3%		96,3%		100%	

Pos=Positivo; Neg=Negativo

menor percentual de positividade (60,5%) nas amostras paucibacilares. Nosso resultado foi inferior aos 70,0% obtidos por Martins *et al.* (23), após a inclusão da etapa de *Nested-PCR*. Entretanto, no presente trabalho não se efetuou a referida etapa.

As diferenças entre os percentuais de positividade do presente trabalho e os da literatura poderiam estar relacionadas com pequenas alterações nos protocolos realizados, tais como os processos de descontaminação das amostras e variações na constituição dos tampões de lise. Esses resultados corroboram a afirmação de Butcher *et al.* (24) de que a positividade da PCR tem grande variação em amostras com baciloscopias negativas e cultivos positivos para *M. tuberculosis*, à qual adicionamos as variações nos protocolos de realização das PCR.

As concordâncias de diagnóstico e as co-positividades e co-negatividades entre os *primers* e os cultivos, tendo como padrão o isolamento de *M. tuberculosis* (Tabela 2), demonstram que os *primers* que amplificaram o fragmento de 123 pb da seqüência IS6110 são os mais indicados no diagnóstico de Tb em amostras clínicas, sejam elas positivas ou negativas na baciloscopia. Apesar de os referidos *primers* não terem propiciado diagnóstico em três das amostras comprovadamente portadoras de *M. tuberculosis* (co-positividade de 94,7%), não houve nenhum resultado falso-positivo (co-negatividade de 100%). Vale ressaltar que nenhum dos *primers* testados apresentou resultados falso-positivos.

Das amostras analisadas pela PCR, em apenas uma os *primers* específicos para amplificação do fragmento de 123pb do alvo IS6110 não detectaram o DNA de *M. tuberculosis*, que somente foi detectado pelos *primers* que amplificam um fragmento de 541 pb do alvo IS6110, e pelos referentes aos alvos 65 kDa e 38 kDa, conforme pode ser visualizado na Tabela 3, relativa à análise de concordância entre as amplificações de DNA pelos *primers*. Tratava-se de uma amostra paucibacilar com o menor número de colônias isoladas por amostra, isto é, quatro colônias nos três tubos de Lowenstein-Jensen semeados.

A seqüência IS6110 está freqüentemente presente em múltiplas cópias no genoma do *M. tuberculosis*. Conseqüentemente, resulta em uma maior sensibilidade da PCR em comparação com amplificações de seqüências de cópias únicas (38

kDa, 65 kDa e MPB64), mesmo quando estas são submetidas a duas reações de PCR consecutivas, como na *Nested-PCR*. O grande percentual de positividade nas amostras do Amazonas pode indicar que as cepas de *M. tuberculosis* apresentam uma maior freqüência de cópias dessa seqüência em seu genoma, passível de ser verificado pelo RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Essa premissa, acrescida das diferenças dos protocolos utilizados na realização da PCR, pode explicar os resultados de positividade superiores aos encontrados na literatura.

Os resultados apresentados indicam que os pares de *primers* estudados servem para identificar seqüências genômicas do *M. tuberculosis* a partir de colônias isoladas em meio de cultivo, estratégia indicada por Kontos *et al.* (25). O protocolo de identificação pela técnica da PCR em 24/48 horas após cultivo torna-se de maior importância quando existe um número insuficiente de colônias, pois, neste caso, os testes de identificação só podem ser realizados após sub-cultivos, o que retarda a identificação da micobactéria por no mínimo mais 21 dias.

Apesar da pequena casuística analisada, conclui-se que existe forte indício de que os *primers* para IS6110 (123 pb) são os mais indicados, no Estado do Amazonas, para realização da PCR em amostras clínicas e em cepas de *M. tuberculosis* manipuladas em serviços de saúde que realizam o diagnóstico laboratorial da Tb. Para ratificação desses resultados faz-se necessário que um número maior de amostras e cepas sejam analisadas frente aos *primers* estudados, e que a técnica seja executada em outras unidades laboratoriais do estado.

REFERÊNCIAS

1. García-Quintanilla A, García L, Tudó G, Navarro M, González J, Anta MTJ. Single-tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1166-9.
2. Montenegro SH, Gilman RH, Sheen P, Cama R, Caviedes L, Hopper T, et al. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian children by use of a heminested IS6110 polymerase chain reaction assay. *Clin Infect Dis* 2003; 36:16-23.
3. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:624-32.
4. 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; 161:977-81.

5. van Soolingen D, de Haas PW, Hermans PW, Groenen PMA, van Embden JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1993; 31:1987-95.
6. Kent L, McHugh TD, Billington O, Dale JW, Gillespie SH. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. J Clin Microbiol 1995; 33:2290-3.
7. McHugh TD, Newport LE, Gillespie SH. IS6110 homologs are present in multiple copies in Mycobacteria Other Than Tuberculosis-causing mycobacteria. J Clin Microbiol 1997; 35:1769-71.
8. Salem JI, Marója MF, Carvalho FF, Lima MO, Feuillet A. Mycobacteria other than tubercle bacilli in sputum specimens from patients in Manaus Amazonas, Brasil. Acta Amazonica 1989; 19:349-54.
9. Salem JI, Gontijo Filho PP, Frebault VL, David HL. Isolation and characterization of mycobacteria colonizing the healthy skin. Acta Leprologia 1989; 7:18-20.
10. Fandinho FCO, Salem JI, Gontijo Filho PP, Marója MF, David HL. Mycobacterial flora of the skin in leprosy. Int J Leprosy 1991; 59:569-5.
11. Campelo CL, Vieira FD, Salem JI, Telles MAS, Maia R, Jardim SBV, et al. Tuberculose - diagnóstico laboratorial - Baciloscopia. Série Telelab. Brasília: Ministério da Saúde; 2001.
12. David LH, Lévi-frébault V, Thorel MF. Méthode de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique. Paris: Institut Pasteur, 1989; 39-58.
13. Abe C, Hirano K, Wada M, Kazumi Y, Takahashi M, Fukasawa Y, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. J Clin Microbiol 1993; 31:3270-4.
14. Pierre C, Lecossier D, Bousougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P, et al. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. J Clin Microbiol 1991; 29:712-7.
15. Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, Kaku M. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol 1993; 31:2228-32.
16. Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, Prasad K, Behari M, Ahuja, GK. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. The Lancet 1991; 337:5-7.
17. Ogusku MM, Sadahiro A, Hirata MH, Hirata RDC, Zaitz C, Salem JI. PCR in the diagnosis of cutaneous tuberculosis. Braz J Microbiol 2003; 34:165-70.
18. Davis LG, Kuehl WM, Battley JF. Basic methods in biology molecular. Connecticut: Appleton & Lange, 1994; 16-21.
19. Perosio PM, Frank TS. Detection and species identification of mycobacteria in paraffin sections of lung biopsy specimens by the polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 1993; 100:643-7.
20. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool. Braz J Med Biol Res 1999; 32:1073-6.
21. Nolte FS, Metchok B, McGowen JE, Jr, Edwards A, Okwumabna O, Thurmond C, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J Clin Microbiol 1993; 31:1777-82.
22. Shawar RM, El-Zaatari FAK, Nataraj A, Clarridge JE. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods. J Clin Microbiol 1993; 31:61-5.
23. Martins LC, Paschoal IA, Von Nowakowski A, Silva SAB, Costa FF, Ward LS. Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. Rev Soc Bras Med Trop 2000; 33:253-7.
24. Butcher PD, Hutchinson NA, Doran TJ, Dale JW. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. in: Mycobacterial disease - old problems, new solutions. (Suplement). J Appl Bacteriol 1996; 81:53S-71S.
25. Kontos F, Petinaki E, Nicolaou S, Gitti Z, Anagnostou S, Maniati M, et al. Multicenter evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system and three molecular methods for the isolation and the identification of mycobacteria from clinical specimens. Diag Microbiol Infect Dis 2003; 46:299-301.