

Afranio Kritski¹

Experiência da Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose no desenvolvimento e avaliação de novos métodos de diagnóstico em tuberculose

The experience of the Brazilian Tuberculosis Research Network in the development and evaluation of new methods of diagnosing tuberculosis

Introdução

De acordo com estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2009, o Brasil está em 18.º lugar entre os 22 países que constituem 80% da carga global da tuberculose (TB). A TB continua a ser a principal causa de morte em indivíduos infetados com VIH, mesmo nos submetidos a HAART (terapia antirretroviral potente) oferecida gratuitamente a todas as pessoas infetadas com VIH, desde 1997. Tal como acontece noutros países em desenvolvimento, há alguma dificuldade em harmonizar a comunicação e o entendimento entre especialistas programáticos em TB, académicos e comunidade, e as organizações não governamentais. Em 2001, a investigação da TB não estava sujeita a quaisquer linhas de orientação quanto a: a) desenvolvimento de novos produtos; b) inovação tecnológica; e c) incorporação de novos instrumentos nos setores público e privado. A Rede Nacional de Investigação da Tuberculose (REDE-TB) foi criada, em 2002, para aproximar as diferentes

Introduction

Brazil ranks 18th out of the 22 countries that bear 80% of the worldwide tuberculosis (TB) burden, according to the World Health Organization (WHO) in 2009. TB is the leading cause of mortality in HIV infected persons, despite all HIV infected persons having received highly active antiretroviral therapy (HAART) free of charge since 1997.

As in other developing nations, there is a significant gap in communication and understanding between TB programme experts, academics, the community, and non-governmental organisations. In 2001, there was no TB research policy in place regarding: a) the development of new products, b) technological innovation and c) the incorporation of new tools in public and private sectors.

In recognition of this gap, a National TB Research Network was established in 2002 to bring together different constituencies to

¹ Coordinator, Diagnostic Area, Brazilian TB Research Network (Rede TB). Academic Tuberculosis Programme, Medical School of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

sensibilidades e promover uma estratégia integrada, multidisciplinar e multi-institucional para controlo e investigação da TB no Brasil. (Rede-TB – www.redetb.org). Nesta apresentação, serão comentadas as atividades da área diagnóstica da Rede TB.

Desenvolvimento, avaliação e incorporação de testes diagnósticos no Brasil

A avaliação da incorporação de novas tecnologias diagnósticas em TB tem sido também priorizada pela Organização Mundial de Saúde após o lançamento do Plano Global de TB da OMS/STOP, em 2006 (http://www.who.int/tb/strategy/stop_tb_strategy/en/). A partir de 2002, apercebemo-nos de que o desenvolvimento diagnóstico e o processo de avaliação proposto pela OMS receberam das partes interessadas atenção e apoios diferentes. Verificou-se um enorme interesse e disponibilidade de fundos relativamente às seguintes fases: a) pré-clínica: descoberta e investigação, desenvolvimento; b) fase 1: avaliação – prova de princípio; c) fase 2: avaliações laboratoriais; e d) fase 3: avaliações de ensaios de campo para análise de desempenho. Mas a fase 4 despertou menos interesse e obteve menos fundos: custo, estudos de impacto e, para a transferência de políticas, pré-qualificação, aprovisionamento, preços negociados, análise de acesso. Em 2007, procedeu-se à avaliação das tendências dos artigos científicos sobre tuberculose no Brasil publicados entre 1986 e 2006. Entre os 1054 trabalhos avaliados, que continham a palavra tuberculose e cujos autores estavam ligados a instituições brasileiras, 486 (46,1%) artigos estavam relacionados com descrição e revisão de casos e séries. Apenas 70 (6,7%) artigos eram estudos

promote an integrated, multi-disciplinary and multi-institutional strategy to TB control and research in Brazil (www.redetb.org). This article describes the Network's work in the area of diagnosis.

The development, evaluation and incorporation of diagnostic tests in Brazil

Evaluating the incorporation of new TB diagnostic techniques was prioritised by the WHO following the 2006 launch of the Global Plan Against TB – WHO/STOP (http://www.who.int/tb/strategy/stop_tb_strategy/en/). Since 2002, we have learned that the diagnostics development and evaluation process proposed by WHO has received different attention and funding by the stakeholders. A lot of interest and available funding has been allocated to the following stages: a) pre-clinical: discovery and research, development, b) phase 1: evaluation – proof of principle; c) phase 2: laboratory evaluations, and d) phase 3: evaluation of field trials for performance analysis. There has been a scarcity of interest and available funding allocated, however, to phase 4: cost, impact studies and policy transfer, prequalification, bulk procurement, negotiated pricing and access analysis.

In 2007 there was an evaluation of the trends in scientific articles on TB in Brazil published between 1986 and 2006. Of 1054 TB publications assessed containing the word 'tuberculosis' with the authors affiliated to Brazilian Institutions, 486 (46.1%) articles were related to descriptive, review and case series reports. Only 70 (6.7%) articles described operational/effectiveness studies or clinical trials (Kritski AL *et al.*, 2007).

operacionais/de eficácia ou ensaios clínicos. (Kritski AL, *et al.*, 2007).

Em 2002, fomos abordados por uma empresa que manifestou interesse em ter os seus testes serológicos registados numa agência reguladora brasileira (ANVISA) para futura comercialização. A avaliação desses testes serológicos demonstrou uma elevada especificidade (95%) entre os controlos saudáveis, mas baixa especificidade (46%) entre os indivíduos suspeitos de serem portadores de TB (Gounder C, *et al.*, 2002). Felizmente, a empresa deixou o mercado brasileiro. Esses resultados são semelhantes aos descritos na revisão sistemática publicada em 2007 (Steingart *et al.*, 2007). Os autores concluíram que no momento não há indicação de *kits* sorológicos comercializados ou testes *in house* no diagnóstico da TB no mundo. Os profissionais de saúde deveriam ser alertados para não utilizarem tais tecnologias na sua prática clínica. Lamentavelmente, esses testes ainda estão à venda em países em desenvolvimento, não tendo sido publicitadas quaisquer recomendações sobre este facto pelas organizações internacionais. Em 2005, iniciou-se uma interação com a “Gerência de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*” da Agência Reguladora Nacional (ANVISA) e efetuou-se uma avaliação dos testes diagnósticos de tuberculose registados na ANVISA no período de 2000 a 2004: 48 foram registados desde 2000, 33 não tinham registo válido mas continuavam no mercado e 14 (30%) eram testes imunoserológicos. Estes testes foram registados em diferentes cenários clínicos no Brasil, sem validação prévia. Estes resultados acentuam a dificuldade de harmonização entre a agência reguladora, os académicos e os decisores que tratam da incorporação de novas tecnologias no Brasil.

In 2002, we were approached by a company interested in having its serological tests registered at the Brazilian regulatory agency (ANVISA) for future commercial use. The evaluation of these serological tests showed a high specificity (95%) in healthy control subjects, but a low specificity in TB suspects (46%) (Gounder C *et al.*, 2002). Fortunately, they withdrew from the Brazilian market. These results are similar to those described in the systematic review published in 2007 (Steingart *et al.*, 2007). The authors concluded that there is currently no indication for commercial serologic testing kits or in-house tests in the diagnosis of TB in the world. Healthcare professionals should be warned not to use these techniques in clinical practice. Unfortunately, these tests are still sold in developing nations and no strict recommendations on them has been issued by international organisations. In 2005 contact was made with the management section of the *in vitro* diagnostic products section of the National Regulatory Agency (ANVISA) and an evaluation of TB diagnostic products tested registered at ANVISA in the period 2000 to 2004 was carried out: 48 had been registered since 2000; 33 had no valid registration, but still remained on the market and 14 (30%) were immunoserological tests. These tests had been registered without prior validation in different clinical settings in Brazil. These results highlighted the gap between the regulatory agency, academics and the policy makers who deal with the incorporation of new technologies in Brazil. Over the last few years, Brazil, along with other developing countries, has seen new molecular technique kits for diagnosing TB or resistant TB enter the market, both polymerase reaction (PCR) and phenotype

Nos últimos anos, como ocorre noutros países em desenvolvimento, no Brasil foram comercializadas novas tecnologias moleculares (*kits* de PCR) ou fenotípicas (MGIT960) no diagnóstico de TB e TB resistente. Entretanto, tais tecnologias têm sido disponibilizadas praticamente na rede privada de laboratórios. Eventualmente foram incluídos em unidades de saúde do sistema público de saúde, mas sem continuidade, por não terem sido incorporados na lista de prioridades do ministério.

Testes fenotípicos para o diagnóstico de TB resistente

Por meio de estudo realizado em três laboratórios de micobacteriologia participantes da Rede-TB, observou-se elevada concordância entre a *performance* do MGIT960 e os três métodos considerados padrão-ouro para o diagnóstico de TB resistente: a) Método de proporções; b) Bactec 460; e c) Razão da resistência (Giampaglia *et al.*, 2007). Em outro estudo, em colaboração com pesquisadores nas Honduras e na Universidade John Hopkins, avaliamos a *performance* do MODS em 854 doentes suspeitos de TB pulmonar. A sensibilidade e a especificidade do MODS foi respectivamente de 96,5% e de 92,6%, o tempo do diagnóstico inferior para MODS (6 dias; interquartil de 5 a 7), em comparação com LJ (21 dias; interquartil 17 a 25 dias) (Arias M *et al.*, 2007). Os estudos sobre a técnica MODS sugerem que ela pode ser útil no diagnóstico da TB sensível às drogas, pois, além de apresentar sensibilidade e especificidade similares aos meios de cultura padronizados, o diagnóstico é bem mais rápido. Entretanto, requer técnicos de laboratório com elevado grau

(MGIT960) kits. These technologies were made available almost exclusively in privately owned laboratories. They were eventually incorporated into healthcare units of the National Health System, but were discontinued as they were not considered Ministry of Health priorities.

Phenotype techniques for diagnosing resistant TB

A study performed in three TB Research Network mycobacteriology laboratories showed a strong agreement between MGIT960 performance and the three gold standard methods for diagnosing resistant TB; the proportion method, Bactec 460 and the resistance ratio method (Giampaglia *et al.*, 2007). Another study, performed by researchers in the Honduras and at the John Hopkins University, evaluated the performance of the microscopic-observation drug-susceptibility (MODS) assay in 854 patients with suspected pulmonary TB. MODS sensitivity and specificity was 96.5% and 92.6%, respectively, and time to diagnosis was quicker for MODS (6 days; 5 – 7 interquartile), than Lowenstein Jensen (LJ) medium (21 days; 17 – 25 interquartile), (Arias M *et al.*, 2007).

Studies on the MODS assay suggest that MODS may be of use in diagnosing drug-susceptible TB as in addition to its sensitivity and specificity – similar to that of standardised culture media – it offers a far quicker diagnosis. It does, however, require laboratory technicians with a high degree of proficiency and biosafety as it uses a liquid medium in Petri dishes. Furthermore, we evaluated the MODS performance for drug resistant TB (DR-TB). In 351 DR-TB suspects, MODS had sensitivity and specificity

de proficiência e de biossegurança, em razão do uso de meio líquido em placas de Petri. Avaliámos, ainda, o desempenho do MODS com a TB resistente (DR-TB). Entre 351 indivíduos suspeitos de DR-TB, o MODS teve sensibilidade e especificidade para isoniazida e rifampicina de 97,2%, 79%, 96,4% e 86,5%, respetivamente (Mello FCQ, *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem que o MODS poderá ser usado para triagem no diagnóstico da DR-TB.

Tecnologias de biologia molecular para diagnóstico de TB e TB resistente

Há grande variabilidade da precisão dos testes moleculares comercializados no diagnóstico da TB ativa, principalmente em doentes imunossuprimidos, com menores valores de sensibilidade em relação a especificidade (Palomino, 2009, Ling 2008, Barnard, 2008). Além disso, em razão dos resultados obtidos em estudos de *performance*, alguns testes moleculares foram aprovados nos órgãos regulatórios de países industrializados e comercializados para uso em amostras respiratórias, ou seja, para a investigação de TB pulmonar, em doentes adultos, sem história prévia de tratamento anti-TB. Portanto, os testes moleculares comercializados no momento não deveriam ser utilizados para o diagnóstico de outras formas de TB, monitoramento do tratamento, e não substituem o exame de cultura para micobactérias.

Nos países desenvolvidos, os resultados positivos da microscopia direta têm um elevado valor indicativo positivo no diagnóstico da tuberculose. Nestas regiões, os testes moleculares podem ter maior impacto no

for isoniazid and rifampicin respectively of 97.2%, 79%, and of 96.4%, 86.5% (Mello FCQ, *et al.*, 2007). These results suggest that MODS might be used as screening technique for DR-TB diagnosis.

Molecular biology techniques for diagnosing TB and resistant TB

There is a great variation in the accuracy of commercial molecular tests for the diagnosis of active TB, mainly in immunosuppressed patients, with lesser sensitivity than specificity (Palomino, 2009, Ling 2008, Barnard, 2008). Further, performance results from studies have led to some molecular techniques being approved by the regulatory bodies of industrialised countries and sold for use in respiratory samples, that is to investigate pulmonary TB in adult patients with no prior history of TB treatment. The molecular tests currently sold should not be used to diagnose other forms of TB or monitor treatment and do not replace a mycobacterial culture exam.

In developing nations, positive direct microscopy results have a high positive predictive value for tuberculosis diagnosis. In those regions, molecular tests may provide a higher impact for diagnosis of smear negative TB cases (SNTB), especially among HIV seropositive cases. However, little data are available on the cost effectiveness and clinical utility of PCR in SNTB, in a setting with a high burden of TB/HIV co-infection (van Cleef, 2005). We evaluated the performance of the PCR dot-blot (developed by Brazilian scientists) in parallel with pretest probability (clinical suspicion) in patients suspected of having SNTB, in a prospective study of 213 individuals with clinical and

diagnóstico de casos de TB com esfregaço negativo TB (ENTB), especialmente entre seropositivos para VIH. Porém, há poucos estudos sobre a relação custo-benefício e utilidade clínica da PCR na ENTB, em regiões com elevada incidência de coinfeção TB/VIH (van Cleef, 2005). Avaliámos o desempenho da PCR *dot-blot* (desenvolvida por cientistas brasileiros) paralelamente à probabilidade pré-teste (suspeita clínica) em doentes suspeitos de ENTB, num estudo prospectivo de 213 indivíduos com suspeita clínica e radiológica de ENTB num hospital de referência de TB/VIH, no Sul do Brasil. Não se observou diferença na sensibilidade da PCR relativamente ao estatuto de VIH (Scherer LC, *et al.*, 2007). No mesmo grupo de estudo, comparámos duas estratégias: o uso de microscopia de esfregaço com bacilos *acid fast* por coloração Ziehl-Neelsen (esfregaço AFB) e cultura; e esfregaço AFB e teste colorimétrico (PCR *dot-blot*), e efectuámos uma análise de custos que incluiu serviços de saúde e custos com os doentes. Os custos totais de *screening* foram 3,7 vezes para o esfregaço AFB e cultura *versus* os custos para esfregaço AFB e PCR *dot-blot* (US\$ 5 651 560 *versus* US\$ 1 513 ,760). O esfregaço AFB e PCR *dot-blot* mostrou melhor relação custo-benefício do que o esfregaço AFB e cultura quando se considerou o custo de tratar todos os casos corretamente diagnosticados (Scherer LC *et al.*, 2009), Estes resultados mostraram que os testes moleculares, mesmo nos países desenvolvidos, são bem aceites e desempenham um papel importante no diagnóstico da ENTB, diminuindo não só o tempo necessário para o diagnóstico, mas ainda a morbidade/mortalidade e a transmissão do *M. tuberculosis* à comunidade

radiological suspicion of SNTB in a TB/HIV referral hospital in southern Brazil. There was no difference in the sensitivity of PCR in relation to HIV status (Scherer LC *et al.*, 2007).

In the same study group we compared two strategies: use of acid fast bacilli smear microscopy by Ziehl-Neelsen staining (AFB smear) plus culture and AFB smear plus colorimetric test (PCR dot-blot) and performed a cost analysis that included health services and patient costs. The total screening costs were 3.7 times higher for AFB smear plus culture than for AFB smear plus PCR dot-blot costs (USD 5,651.560 *versus* USD 1,513. 760). AFB smear plus PCR dot-blot was more cost-effective than AFB smear plus culture, when the cost of treating all correctly diagnosed cases was considered (Scherer LC *et al.*, 2009). These results show that molecular tests, even in developing nations, are welcome and play an important role in SNTB diagnosis, cutting diagnostic delay, morbid-mortality and *M. tuberculosis* transmission to the community, even in regions with a high rate of HIV infection.

Molecular tests for diagnosing multi-drug resistant TB (MDR-TB)

Of the molecular tests sold worldwide for a swift diagnosis of resistant TB, the following are accurate: INNO-LIPA Rif.TB kit (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium), GenoType® MDRTB and GenoType®MDRTB plus assays (Hain Lifescience, GMBH, Germany), TB Research Network researchers undertook a study into the accuracy of selected samples using the INNO-Lipa Rif.TB kit and found a high level of agreement with the reference tests in selected samples (Oli-

de, mesmo em regiões com grande incidência de infecção por VIH.

Testes moleculares para o diagnóstico de TB multirresistente

Entre os testes moleculares comercializados, a nível mundial, para o diagnóstico rápido de TB resistente que mostraram boa acurácia: o *kit* INNO-LIPA Rif.TB (Innogenetics, Zwijndrecht, Bélgica), o ensaio de GenoType® MDRTB e GenoType® MDRTBplus (Hain Lifescience, GmbH, Alemanha), pesquisadores da Rede TB realizaram estudo de acurácia em amostras selecionadas ao utilizarem o *kit* INNO-Lipa Rif.TB e observaram elevada concordância com testes de referência em amostras selecionadas. [Oliveira M, 2005]. Entretanto, até ao momento, não há estudos publicados na literatura sobre a *performance* de tais testes moleculares em condições de rotina, em países em desenvolvimento. Recentemente, avaliamos o desempenho da sequenciação de ADN em 38 (26%) doentes (99 amostras clínicas) com resultados discordantes entre MODS e métodos proporcionais. Surpreendentemente, verificámos um elevado índice de heterorresistência a RIF e/ou INH (21,7%) e de superinfecção (28,9%), usando a técnica *spoligotyping*, sendo a maioria Lam, Haarlem, e T1 [Andrade *et al.*, 2009]. Resultados semelhantes foram observados na África do Sul e no Usbequistão. Van Rie *et al.* (2005) avaliaram 186 doentes com TB, encontrando superinfecção em 23% (14/62) de casos relatados e em 17% (21/1254) dos casos. Hofmann-Thiel *et al.* (Hofmann-Thiel S, *et al.*, 2009) avaliaram 35 casos de TB, encontrando superinfecção em 8,6%. Em ambos estudos, a maioria das superinfecções esteve relacionada com a família M.tb Beijing. Mais recentemente,

veira M, 2005). That said, there are as yet no published studies in the literature into the performance of these molecular tests under routine conditions in developing countries.

We recently evaluated the performance of DNA sequencing in 38 (26%) patients (99 clinical samples) with discordant results between MODS and the proportion method. Surprisingly, we found high rate of heteroresistance to RIF and/or INH (21.7%) and of superinfection (28.9%) using the spoligotyping technique, with the majority Lam, Haarlem, and T1 (Andrade *et al.*, 2009). Similar results were seen in South Africa and in Uzbekistan. Van Rie *et al.* (Van Rie 2005) evaluated 186 TB patients, finding superinfection in 23% (14/62) retreatment cases and in 17% (21/1254) of cases. Hofmann-Thiel *et al.* (Hofmann-Thiel S *et al.* 2009), evaluating 35 TB cases, found superinfection in 8.6%.

In both studies the majority of superinfection was related to the M.tb Beijing family. More recently, Hillemann *et al.* (Hillemann D, 2009), compared the accuracy of the new MTBDRsl assay for extensively drug-resistant TB (XDR-TB) which included detection of fluoroquinolone, amikacin-capreomycin and ethambutol resistance testing. Among 106 selected clinical isolates, resistance to rifampicin and isoniazid was found in 63 (59.4%) cases. Ofloxacin resistance was found in 32 (30.2%) cases and heteroresistance was observed in 21.9% (7/32). The high rates of heteroresistance and superinfection identified in those studies in clinical samples collected from DR-TB suspects highlight the need to evaluate the impact of the use of line probe assays in DR-TB suspects before its incorporation into

Hillemann *et al.* (Hillemann D, 2009), compararam a precisão do novo ensaio MTBDRsl para XDR-TB, que incluiu a detecção da resistência aos testes com fluoroquinolona, amikacin-capreomicina e etambutol. Entre 106 isolados clínicos selecionados, observaram resistência a rifampicina e a isoniazida em 63 (59,4%) dos casos. Observaram resistência à ofloxacina em 32 (30,2%) e heterorresistência em 21,9% (7/32). Os elevados índices de heterorresistência e de superinfecção identificados nesses estudos em amostras clínicas colhidas de indivíduos suspeitos de DR-TB acentuam a necessidade de avaliar o impacto do uso de ensaios *line probe* nestes suspeitos, antes da sua incorporação na prática clínica, especialmente nos países em desenvolvimento.

Mais recentemente, a Rede TB, juntamente com pesquisadores da *Union International Contra Tuberculosis*, do *Management Science for Health*, do Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, da Fiocruz, e técnicos do Programa Nacional de TB e do Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde, elaboraram uma plataforma de protocolos de pesquisa de viabilidade e impacto econômico a serem realizados em diferentes regiões do país, que inclui o uso do teste Xpert™ MTB/Rif (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) para o diagnóstico de TB e TB resistente e o uso do teste GenoType® MDRTBplus e MTBDRsl *assay* (Hain Lifescience, GMBH, Alemanha) para o manuseio do doentes suspeitos de TB-MDR e TB-XDR, respetivamente

clinical practice, especially in developing nations.

More recently, the TB Research Network along with researchers from the International Union Against Tuberculosis of the Management Science for Health of the Centro de Referência Prof Helio Fraga da Fiocruz and technicians from the National TB programme and the Ministry of Health's Department of Science Technology drew up feasibility and economic impact research protocols agreements. These are to be carried out in different regions of Brazil and include use of the Xpert™ MTB / Rif (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) test for diagnosing TB and resistant TB and use of the GenoType® MDRTB plus test and MTBDRsl assay (Hain Lifescience, GMBH, Germany) for the management of patients with suspected MDR-TB and XDR-TB, respectively.

Bibliografia/Bibliography

- Andrade MK, Dalcolmo M, Marsico AG, Mello FCQ, Dorman S, Rossetti ML, Fonseca LS, de Oliveira MM, Kritski A. 40th World Conference on Lung Health. Cancun, México 3-7 December, 2009 (www.worldlung-health.org).
- Arias M, Mello FC, Pavon A, Marsico AG, Alvarado-Gálvez C, Rosales S, Pessoa CL, Perez, Andrade MK, Kritski AL, Fonseca LS, Chaisson RE, Kimerling ME, Dorman SE. The microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay for detection of tuberculosis and tuberculosis drug resistance: results from a multi-center study. *Clin Infect Dis* 2007;44(5):674-80. Epub 2007 Jan 22.
- Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am J Resp Crit Care* 2008, 177: 787-792.
- de Oliveira MM, da Silva Rocha A, Cardoso Oelemann M, Gomes HM, Fonseca L, Werneck-Barreto AM, Valim AM, Rossetti ML, Rossau R, Mijs W, Vanderborgh B, Suffys P. Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phase hybridization assay. *J Microbiol Methods* 2003; 53(3):335-342.
- Flores LL, Pai M, Colford JM, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol* 2005; 5: 55.
- Giampaglia MS, Martins MC, Vieira GBO, Vinhas SA, da Silva Telles MA, Palaci M, Marsico AG, Hadad DJ, Mello FCQ, Kritski A, Siddiqi S, Fonseca LS. Multi-center Evaluation of Automated Bactec MGIT 960 System for testing susceptibility of *M. tuberculosis* as compared with BACTEC 460TB, proportion and resistance ratio methods in Southeast of Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11(9):986-991.
- Global Plan against TB – WHO/STOP em 2006 (http://www.who.int/tb/strategy/stop_tb_strategy/en/).
- Gounder C, Mello FCQ, Conde MB; Kritski A, Chaisson RE, Dorman S. Field evaluation of a rapid immunochromatographic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6):1477-1451.
- Hofmann-Thiel S, van Ingen J, Feldmann K, Turaev L, Uzakova GT, Murmusaeva G, van Soolingen D, Hoffmann H. Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of *Mycobacterium tuberculosis* in Tashkent, Uzbekistan. *Eur Respir J* 2009;33(2):368-374. Epub 2008 Oct 1.
- Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2009; 47(6):1767-1772. Epub 2009 Apr 22.
- Kritski AL, Villa TS, Trajman A, Lapa e Silva, JR Medronho RA, Ruffino-Netto A. Two decades of research on tuberculosis in Brazil: state of the art of scientific publications. *Rev Saude Publica* 2007;41(Supl):9-14.
- Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One* 2008; 2:e1536.
- Mello FCQ, Arias M, Pavón A, Marsico AG, Alvarado-Gálvez C, Rosales S, Pessoa CEC, Pérez M, Andrade MK, Kritski AL, Fonseca LS, Chaisson RE, Kimerling M, Dorman, SE. Clinical evaluation of the microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to isoniazid or rifampin. *J Clin Microbiol* 2007; 45(10):3387-3389.
- Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. Minireview. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 1-9.
- Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose – Rede Tb (www.redetb.org)
- Scherer LC, Sperhake RD, Mello FCQ, C Jarczewski, Cafrune P, Minghelli S, Osorio M, Rossetti ML, Kritski AL. PCR colorimetric dot-blot assay and clinical pretest probability for diagnosis of pulmonary tuberculosis in smear-negative patients *BMC Public Health* 2007; 7(1):356.
- Scherer LC, Sperhake RD, Ruffino-Netto A, Rossetti, MLR, Kritski AL. Cost-effectiveness analysis of the PCR associated with Ziehl Neelsen smear examination (ZN) for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in subjects with and without HIV in a hospital setting. *BMC Public Health* 2009 (in press).
- Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M. Commercial serological antibody detection tests for the

diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. PLoS Med 2007 Jun; 4(6):e202. Erratum in: PLoS Med 2007; 4(8):e254.

Van Cleeff M, Kivihya-Ndugga L, Githui W, Ng'ang'a L, Kibuga D, Odhiambo J, Klatser P. Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya. Int J Tuberc Lung Dis 2005; 9(8):877-883.

Van Rie A, Victor TC, Richardson M, Johnson R, van der Spuy GD, Murray EJ, Beyers N, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tubercu-*

losis drug-resistance patterns. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172(5):636-642. Epub 2005 Jun 9.

WHO – 2007 recommendations – use of liquid médium for TB and drug resistant TB diagnosis <http://www.who.int/tb/dots/laboratory/en/index.html>.

WHO – 2008 recommendations – use of line molecular probe assays for drug resistant TB diagnosis (http://www.who.int/tb/features_archive/mdrtb_rapid_tests/en/index.html).

[WHO] World Health Organization 2009. Global Tuberculosis Control. WHO Report. Geneva, Switzerland.