



Acta Scientiarum. Health Sciences

ISSN: 1679-9291

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá
Brasil

Hirayama Takao, Elisa Keiko; Nocchi, Samara R.; Dias Siqueira, Vera Lúcia; Cardoso, Marco Antonio;
Dias Peron, Maria Luisa; Rizieri Callefi, Katiany; Fressatti Cardoso, Rosilene
Comparação de métodos de cultivo para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar
Acta Scientiarum. Health Sciences, vol. 27, núm. 2, 2005, pp. 183-188
Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=307223952013>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Comparação de métodos de cultivo para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar

Elisa Keiko Hirayama Takao¹, Samara R. Nocchi¹, Vera Lúcia Dias Siqueira¹, Marco Antonio Cardoso², Maria Luisa Dias Peron³, Katiany Rizieri Calfe³ e Rosilene Fressatti Cardoso^{1*}

¹Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ²Pós-graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. ³Pós-graduação em Análises Clínicas, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá. *Autor para correspondência. e-mail: rfcardoso@uem.br

RESUMO. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização dos métodos de cultivo de escarro, Ogawa-Kudoh (O-K) e Petroff com tempo de descontaminação reduzido (Petroff-R), na rotina laboratorial de diagnóstico da tuberculose pulmonar. Um total de 459 amostras de escarro, de pacientes sintomáticos respiratórios, foram cultivadas utilizando os métodos O-K e Petroff-R, paralelamente ao método clássico de Petroff. Os métodos O-K e Petroff-R mostraram-se eficientes na detecção de *Mycobacterium tuberculosis* e de micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* inclusive em amostras com baciloscopias negativas. Não houve diferença estatística entre a contaminação observada no método de O-K e Petroff. Estes dados sugerem que o método O-K, por ser de fácil execução, baixo custo, apresentar baixo risco de contaminação do manipulador e boa sensibilidade na detecção de *M. tuberculosis* representa excelente recurso na rotina bacteriológica para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Palavras-chave: micobactérias, cultura, diagnóstico, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT. Comparison of culture methods in pulmonary tuberculosis laboratorial diagnosis. This study aimed to evaluate different methods for culturing sputum, Ogawa-Kudoh (O-K) and Petroff, using reduced time for decontamination (Petroff-R), expecting to know their effectiveness in tuberculosis laboratory diagnosis. Four hundred and fifty-nine sputum samples of patients with pulmonary symptoms were cultured using O-K and Petroff-R, to be compared with the regular Petroff method. O-K and Petroff-R methods showed efficient sensitivity in isolating *Mycobacterium tuberculosis* and micobacteria other than tuberculosis, even in samples with negative acid fast smear. Statistics analysis showed similar contamination rate for O-K when compared to Petroff. These data suggest that O-K, being easy to perform, having low costs, presenting low risk of worker contamination and good sensitivity in detecting *M. tuberculosis*, should be used in clinical laboratories as a good resource at tuberculosis diagnosis.

Key words: mycobacteria, culture, diagnosis, *Mycobacterium tuberculosis*

Introdução

A tuberculose é uma doença infecto contagiosa conhecida há séculos e continua sendo um importante problema de saúde pública (Ministério da Saúde, 1992; Snider *et al.*, 1994). O incremento da pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e sua associação com a tuberculose, a deterioração das condições sócio-econômicas com baixa de condições sociais,

migração, deficiências das instituições de saúde, aumento dos casos resistentes às drogas antituberculosas, provocou um grande alerta mundial para o combate à enfermidade (Barco e Cardoso, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose mata aproximadamente 2 milhões de pessoas a cada ano e é estimado que entre 2002 e 2020 aproximadamente 1 bilhão de

indivíduos serão infectados, e destes, 150 milhões apresentarão sintomas da doença resultando em 36 milhões de mortes, se o controle não for assumido urgentemente (World Health Organization, 2003).

O recente relatório de epidemiologia da tuberculose elaborado pela OMS calcula que ocorreram 8,8 milhões de casos novos de tuberculose no mundo em 2003 (140/1.000.000 habitantes) dos quais 3,9 milhões apresentaram baciloscopia positiva e 674.000 eram pacientes co-infectados com HIV. Neste relatório estima-se que 1,7 milhões de pessoas (28/100.000 habitantes) morreram por tuberculose em 2003, incluindo casos co-infectados com HIV (World Health Organization, 2005).

Os dados nacionais apontam que cerca de 25 a 30% da população brasileira encontra-se infectada pelo bacilo da tuberculose (aproximadamente 40 milhões de pessoas). Desses, cerca de 90 mil casos clínicos de tuberculose ocorrem anualmente, levando a cinco mil óbitos. O número de casos notificados não representa a plena realidade, pois parte considerável dos doentes não é registrada oficialmente (Barco e Cardoso, 2003).

No Brasil, o Programa de Controle da Tuberculose (PCT) tem como meta principal a descoberta precoce de casos novos e instituição imediata do tratamento dos casos infectantes (baciloscopia positiva) para a interrupção da cadeia de transmissão. Neste contexto, o laboratório clínico desempenha uma importante ação através de técnicas que exercem influência no diagnóstico e nas ações epidemiológicas a serem desenvolvidas. Dentre os procedimentos laboratoriais, a baciloscopia (pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes - BAAR) e a cultura são as técnicas convencionalmente recomendadas pelos órgãos governamentais responsáveis pela saúde pública, embora outras mais sofisticadas (Reação em Cadeia da Polimerase, Cromatografia de Alta Resolução) tenham sido desenvolvidas, mas que no momento são inviáveis ao setor público em razão do seu alto custo (Bollela *et al.*, 1999).

A baciloscopia tem sido utilizada como exame básico para o diagnóstico da tuberculose, por ser simples, rápida, confiável e de baixo custo, porém apresenta sensibilidade que varia de 22 a 78% quando comparada com a cultura (Boyd e Marr, 1975; Susemihl *et al.*, 1993; Coelho *et al.*, 1999; Della-Latta, 2004), além de impossibilitar o isolamento da micobactéria, não permitindo desta forma a identificação da espécie, nem a avaliação do perfil de resistência às drogas antituberculosas. Para obtenção de um resultado positivo na baciloscopia

são necessários pelo menos 5.000 bacilos/mililitro de escarro.

Na detecção do *M. tuberculosis* a cultura é considerada o “padrão ouro”, sendo necessário no mínimo de 10 a 100 células bacterianas viáveis para obter um resultado positivo (Ministério da Saúde, 1994; Bollela *et al.*, 1999). Segundo Kennedy e Fallow (1979), a sensibilidade da cultura pode variar entre 20 a 90%, dependendo da quantidade da amostra submetida à cultura e da infra-estrutura do laboratório no tratamento prévio de descontaminação da amostra a ser cultivada. Dados significativos de pacientes com cultura positiva e que apresentaram baciloscopia negativa, foram obtidos em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, demonstrando que a realização da cultura aumentou a cobertura do diagnóstico precoce da tuberculose, em pacientes paucibacilares (Fressatti-Cardoso *et al.*, 1998).

É fato a necessidade de utilização de uma metodologia simples, sensível e de baixo custo para o tratamento prévio das amostras de escarro visando sua descontaminação com microrganismos da flora normal e do meio ambiente e então viabilizar o isolamento de micobactérias.

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi comparar os métodos de O-K e Petroff-R, com o método clássico de Petroff e semeadura em L-J, recomendado pelo PCT em todo o território nacional (Ministério da Saúde, 1994), enfocando eficácia de diagnóstico e possibilidade de implantação na rotina laboratorial, ampliando assim a cobertura no diagnóstico da tuberculose pulmonar em nossa região.

Material e métodos

Amostras clínicas

As amostras de escarros foram obtidas de pacientes sintomáticos respiratórios com suspeita clínica de tuberculose, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde do município de Maringá/Paraná e cidades vizinhas e encaminhadas ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (Lepac), Estado do Paraná, no período de junho de 2004 a março de 2005. Foram analisadas 459 amostras de escarro, de 298 pacientes sintomáticos respiratórios. As amostras foram coletadas de acordo com as normas recomendadas pelo Laboratório Nacional de Referência Prof. Hélio Fraga, Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro (Ministério da Saúde, 1994), conservadas a temperatura de 4 – 10°C e processadas até um

período máximo de cinco dias.

Procedimentos Bacteriológicos

Baciloscopia

Para a pesquisa de Bacilos Ácido-Resistentes (BAAR) foram feitos esfregaços de cada amostra de escarro e corados utilizando o método de Ziehl-Neelsen (Smithwick, 1976; Ministério da Saúde, 2002). Efetuou-se a leitura das lâminas e quantificação bacilar segundo a escala semiquantitativa (Ministério da Saúde, 1994). Para a confirmação dos resultados negativos foi observada toda a extensão da lâmina.

Cultura

Método de Ogawa-Kudoh (O-K)

Um volume homogeneizado de escarro foi colocado em tubo de vidro (16 x 100 mm) estéril e de fundo cônico. Em seguida, um “swab” estéril foi introduzido e através de movimentos rotatórios, o mesmo foi impregnado com a amostra de escarro. Após, o “swab” foi imerso em solução descontaminante (NaOH 1N) em temperatura ambiente por 2 minutos. O excesso da solução de NaOH 1N foi retirado pela compressão do “swab” contra a parede do tubo, e semeado, em duplicata, no meio Ogawa-Kudoh (Kudoh e Kudoh, 1974; Susemihl et al., 1993; Coelho et al., 1999).

Método de Petroff e Petroff Reduzido (Petroff-R)

Um volume de aproximadamente 2 mL de escarro foi distribuído em 2 tubos de vidro (16 x 100 mm) estéreis e de fundo cônico. A amostra contida no primeiro tubo foi tratada pelo método de Petroff (Ministério da Saúde, 1994) e o precipitado neutralizado e semeado, em duplicata, em meio de Lowenstein-Jensen (L-J). A amostra contida no segundo tubo foi processada pelo método de Petroff-R, com diminuição do período total do processo de descontaminação de 55 para 25 minutos. Neste método reduziu-se o tempo inicial de descontaminação de 30 para 10 minutos e o tempo de centrifugação da amostra para 10 minutos. As etapas de neutralização do sedimento e semeadura em L-J foram processadas conforme o método de Petroff.

As culturas foram incubadas na temperatura de 35°C, durante 60 dias com inspeção semanal para detecção de crescimento micobacteriano e as culturas submetidas a contagem de colônias e os

resultados registrados (Ministério da Saúde, 1994).

Identificação bioquímica dos isolados de BAAR

As colônias que sugeriram crescimento de micobactérias foram examinadas microscopicamente após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen. Os isolados de BAAR foram identificados por provas bioquímicas de produção de niacina, redução do nitrato a nitrito, crescimento em presença de ácido p-nitrobenzóico (PNB) e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) (Kent e Kubika, 1985; Ministério da Saúde, 1994).

Análise estatística

A comparação de eficácia de detecção de micobactérias e em especial de *M. tuberculosis* e de perda da amostra por contaminação da cultura foi testada utilizando o teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5% (Software Estatística 6.0).

Aspectos éticos

Os princípios éticos que permearam este estudo basearam-se na resolução nº 196/96 das Diretrizes e Normas Regulamentadora que envolve pesquisa em seres humanos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente em Ética e Pesquisa (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná - Parecer nº 076/2005.

Resultados

Foram avaliadas 459 amostras de escarros, simultaneamente, pelos três métodos de tratamento prévio de descontaminação para realização da cultura para BAAR. Destas, 31 apresentaram resultado positivo na baciloscopia (Ziehl-Neelsen) que variou de (+) a (+++) e 428 apresentaram resultado negativo.

O resultado obtido com os três métodos de cultivo (Petroff, Petroff-R e O-K) no processamento de todas as amostras, para isolamento de micobactérias encontra-se apresentado na Tabela 1.

Das amostras de escarros com baciloscopia negativa para BAAR (n=428), um total de 11 apresentaram cultura positiva para *M. tuberculosis*, quando associadas as 3 metodologias de cultivo. O resultado das culturas de amostras com baciloscopia negativa encontra-se apresentados na Tabela 2.

A quantificação bacilar realizada na baciloscopia e o número de colônias isoladas nas culturas foi similar nas três metodologias estudadas, principalmente nos casos de resultado (++) e (+++) na baciloscopia (Tabela 3).

Tabela 1. Percentual de isolamento de BAAR e contaminação nas 459 amostras de escarro cultivadas utilizando os métodos Petroff, Petroff-R e O-K.

Resultado das culturas	Petroff Nº(%)	Petroff-R Nº(%)	O-K Nº(%)
Isolamento de <i>M. tuberculosis</i>	37(8,1%)	39(8,5%)	36(7,9%)
Negativa para BAAR	412(89,8%)	395(86,1%)	414(90,2%)
Isolamento de Micobactérias não pertencentes ao complexo <i>M. tuberculosis</i>	02(0,4%)	07(1,5%)	02(0,4%)
Contaminação da cultura	08(1,7%)	18(3,9%)	07(1,5%)
Total de culturas realizadas	459(100%)	459(100%)	459(100%)

Nº, Número

Tabela 2. Percentual de culturas positivas para BAAR processadas pelos métodos Petroff, Petroff-R e O-K em 428 amostras de escarros com baciloscopia negativa.

BAAR isolado	Petroff Nº(%)	Petroff-R Nº(%)	O-K Nº(%)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	06(1,4%)	08(1,9%)	05(1,2%)
Micobactérias não pertencentes ao complexo <i>M. tuberculosis</i>	02(0,5%)	07(1,6%)	02(0,5%)
Total	08(1,9%)	15(3,5%)	07(1,7%)

Nº, Número

Tabela 3. Comparação da quantificação bacilar na baciloscopia (Ziehl-Neelsen) com o resultado das culturas utilizando os métodos Petroff, Petroff-R e O-K.

Baciloscopia / nº amostras	(+) / 09				(++) / 05				(+++) / 17			
Escala	<20	(+)	(++)	(+++)	<20	(+)	(++)	(+++)	<20	(+)	(++)	(+++)
crescimento em cultura												
Nº de culturas positivas no método de Petroff	2	3	4	0	0	0	0	5	0	0	0	17
Nº de culturas positivas no método de Petroff-R	1	3	5	0	0	0	0	5	0	0	0	17
Nº de culturas positivas no método O-K	2	5	2	0	0	0	0	5	0	0	0	17

Nº, Número; < 20, crescimento inferior a 20 colônias de BAAR; (+), crescimento de 20 a 100 colônias; (++) , crescimento de mais de 100 colônias isoladas; (+++), crescimento de colônias confluentes.

A comparação de positividade para o isolamento de *M. tuberculosis* e micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* entre os dois métodos testados, O-K e Petroff-R, em relação ao método clássico de Petroff não mostrou diferença estatística ($p=0,8971$ para O-K e $p=0,3644$ para Petroff-R) mesmo em casos onde a amostra apresentava baciloscopia negativa ($p=0,7945$ para O-K e $p=0,1390$ para Petroff-R).

Não houve diferença estatística na avaliação do processo de descontaminação das amostras de escarro ($p=0,7946$) quando comparado o método de O-K em relação ao de Petroff. No entanto, o método Petroff-R apresentou menor eficácia de descontaminação em relação ao método de Petroff ($p=0,0467$).

Discussão

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os métodos de O-K e Petroff-R, este último proposto em nosso laboratório, foram eficientes no isolamento de *M. tuberculosis* e micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, inclusive em amostras de escarros com baciloscopia negativa para BAAR (amostras paucibacilares).

Das 428 amostras de escarro com baciloscopias negativas para BAAR, 11 apresentaram cultura positiva para *M. tuberculosis*, quando associadas as três metodologias de cultivo. Foi observado que mesmo isoladamente, os métodos Petroff-R e O-K apresentaram boas condições para detecção de *M. tuberculosis*, quando comparado com o Petroff, comprovando o aumento da sensibilidade no diagnóstico da tuberculose. É fato consumado que a associação da cultura à baciloscopia permite maior cobertura no diagnóstico laboratorial da tuberculose, além de possibilitar o isolamento do bacilo para a identificação das espécies e o estudo do perfil de susceptibilidade às drogas visando adotar medidas de controle da doença (Ministério da Saúde, 1994; Boffo et al., 2003).

No Brasil, segundo as normas do PCT o método de descontaminação de escarro recomendado para realização de cultura é o de Petroff com semeadura em L-J (Ministério da Saúde, 1994). Considerando o custo e as dificuldades operacionais dos laboratórios locais para o cultivo e identificação de BAAR a cultura somente é solicitada em alguns casos (Ministério da Saúde, 1994; Cardoso, 2003). Desta forma, o emprego de uma metodologia simplificada de cultura para BAAR, bem como de baixo custo pode, auxiliar para um diagnóstico definitivo da tuberculose, uma vez que o diagnóstico precoce é decisivo para interromper a cadeia de transmissão (Kennedy e Fallow, 1979; Bollela et al., 1999).

Ambos métodos avaliados (O-K e Petroff-R) apresentaram eficácia de isolamento de micobactérias comparável ao método clássico de Petroff. Embora, tenha sido observado um número maior de isolamento de micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* quando da utilização do método de Petroff-R, o mesmo apresentou um índice de contaminação que pode

levar a perda de um número expressivo de amostras de escarro, inclusive as paucibacilares. Da mesma forma, a complexidade técnica de realização da cultura e o risco de contaminação do manipulador no método de Petroff-R, são os mesmos do método de Petroff o que torna a aplicação rotineira do Petroff-R desfavorável.

No que se refere à capacidade de descontaminação das amostras de escarro, o método O-K apresentou resultado semelhante ao obtido com o método de Petroff (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos nos trabalhos de Susemihl *et al.* (1993) e Coelho *et al.* (1999).

Da mesma forma que estes autores, o presente resultado permite indicar o uso do método O-K na rotina bacteriológica em substituição ao método de Petroff (Ministério da Saúde, 1994) considerando que o mesmo apresentou sensibilidade e capacidade de descontaminação da amostra de escarro semelhante ao Petroff.

É interessante salientar que o método O-K proporcionou um índice de crescimento bacteriano em menor tempo, dado este observado também por Susemihl *et al.* (1993) e Coelho *et al.* (1999). Segundo estes mesmos autores, esta redução no tempo de aparecimento de colônias visíveis observadas na metodologia de O-K provavelmente se deva ao processo de semeadura realizada com "swabs" permitindo uma melhor distribuição bacilar na superfície do meio. Em nossa opinião este fato deve, também, ser decorrente da diferença, embora pequena, na composição dos meios de cultivo utilizado no método O-K e do meio L-J (Kudoh e Kudoh, 1974; Susemihl *et al.*, 1993; Coelho *et al.*, 1999).

Além destas vantagens, o método O-K, segundo Coelho *et al.* (1999), permite que a cultura seja mantida à temperatura ambiente por um período de até vinte dias, o que possibilita o seu envio de locais distantes para incubação e dar continuidade da mesma em laboratórios de referência o que não foi avaliado no presente trabalho.

Em suma, a sensibilidade, praticidade de realização do método O-K, segurança para o manipulador, bem como a formulação simples do meio e menor custo, devido a não incorporação de asparagina (Kudoh e Kudoh, 1974) permite considerar o método O-K como um excelente recurso para cultura de BAAR em laboratórios com pequeno suporte financeiro e de recursos humanos. Deve ainda ser considerado a necessidade de um estudo de perfil de susceptibilidade às drogas antituberculosas em isolados de *M. tuberculosis* obtidos concomitantemente em ambos os métodos

(O-K e Petroff).

Referências

- BARCO, P.; CARDOSO, R.F. Tuberculose e Resistência a Drogas. *Laes & Haes*, São Paulo, v. 1, n. 141, p. 130-144, 2003.
- BOFFO, M.M.S. *et al.* Diagnóstico laboratorial da tuberculose na cidade do Rio Grande, RS, Brasil. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 35-38, 2003.
- BOLLELA, V.R. *et al.* Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Rev. Saúde Pub.*, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 281-286, 1999.
- BOYD, J.C.; MARR, J.J. Decreasing reliability of acid-fast smear techniques for detection of tuberculosis. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 82, p. 489-492, 1975.
- COELHO, A.G.V. *et al.* Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o isolamento de micobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 57-61, 1999.
- CARDOSO, R.F. *Análise de mutações nos genes relacionados com resistência a isoniazida (INH) em isolados clínicos de Mycobacterium tuberculosis de origem brasileira*. 2003. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- DELLA-LATTA, P. Mycobacteriology and Antimycobacterial susceptibility Testing. In: ISENBERG, H.D. (Ed.). *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington, D.C.: ASM Press, 2004. section 7, p. 7.0.1-7.8.8.
- FRESSATTI-CARDOSO, R.; *et al.* Incidência de micobactérias isoladas de material biológico humano no LEPAC durante o período de setembro de 1996 a dezembro de 1997. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*, Paranaíba, v. 2, n. 2, p. 2002, 1998.
- KENNEDY, D.H.; FALLON, R.J. Tuberculosis diagnostic. *J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v. 241, p. 264 - 268, 1979.
- KENT, P.T.; KUBICA, G.P. Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory. U.S Department of Health and Human Services. CDC. Atlanta, 1985.
- KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull. World. Org.*, Santé, v. 51, p. 71-82, 1974.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão de Pneumologia Sanitária. Campanha Nacional Contra a Tuberculose. *Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço*. 3. ed. Rio de Janeiro, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. *Manual de bacteriologia da Tuberculose*. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. *Manual Técnico para o Controle da Tuberculose*. Brasília, 2002.

SMITHWICK, R.S. *Laboratory Manual for Acid-Fast Microscopy*. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Center for Disease Control and Control. Atlanta, 1976.

SNIDER, D.E. et al. A. Global burden of tuberculosis. In: BLOOM, B.R. (Ed.). *Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control*. Washington, D.C.: Am. Soc. Microbiol. Press, cap. 1, p. 3- 11. 1994.

SUSEMIHL, M.A.A.M.M. et al. Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias. *Rev. Bras. Patol. Clín.*, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 51-54, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global

Tuberculosis Control. WHO Report 2003. [S.1.: s.n.], 2003. Disponível em < <http://www.who.int/gtb/publications/globrep/pdf/country-profiles/bra.pdf>> Acesso em: 04 jun. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Report 2005-Improving case detection and treatment. [S.1.: s.n.], 2005. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report2005/summary/en/index.html>. Acesso em: 10 fev. 2005.

Received on April 18, 2005.

Accepted on December 08, 2005.