

ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

**ABORDAGENS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO
DAS FORMAS DE TUBERCULOSE: Revisão da literatura**

Ana Célia de Oliveira Ambrósio Pires

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2023

ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

**ABORDAGENS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO
DAS FORMAS DE TUBERCULOSE: Revisão da literatura**

Ana Célia de Oliveira Ambrósio Pires

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Academia de Ciência e
Tecnologia como requisito parcial para
obtenção de título.

Orientador: Prof^a Dr^a Margarete tereza
Gottardo de Almeida

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2023

RESUMO

Introdução: *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo gram-positivo responsável pela tuberculose (TB) em humanos. Embora a forma pulmonar da infecção seja a mais comum, ela também pode ocorrer em outros órgãos e sistemas, caracterizando a forma disseminada da doença. Apesar dos esforços para o controle epidemiológico da doença, a TB continua sendo importante causa de morbimortalidade ao redor do mundo, especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil. Pacientes infectados não diagnosticados são importantes formas de disseminação da doença. Posto isso, o diagnóstico dos sintomáticos e de indivíduos em risco para a infecção é pedra-angular no controle epidemiológico da TB. **Objetivo:** Apresentar os diferentes testes bacteriológicos e histopatológicos empregados nesta infecção, em sua forma primária ou secundária, latente ou ativa. **Métodos:** Revisão narrativa baseada em artigos e diretrizes publicados e disponíveis nas bases de dados Scielo, Medline e Lilacs, com o intuito de revisar sobre os testes empregados no diagnóstico laboratorial da tuberculose. **Revisão:** Existe uma gama de técnicas disponíveis para o diagnóstico da tuberculose, cada uma com suas vantagens, desvantagens e características distintas. Os métodos clássicos ainda bastante utilizados incluem o exame direto do escarro, o teste tuberculínico (TT) e a cultura. O TT é eficaz na detecção de infecções latentes, mas não é suficiente para confirmar a tuberculose ativa, enquanto a cultura, apesar de ser o padrão-ouro para o diagnóstico, tem como limitação seu tempo de processamento. Os avanços tecnológicos trouxeram novas ferramentas diagnósticas como a radiografia e a tomografia computadorizada, que permitem a visualização direta dos pulmões e outros órgãos possivelmente afetados. Além disso, testes moleculares como a amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) oferecem resultados mais rápidos e precisos, porém são mais caros e requerem infraestrutura laboratorial específica. A análise de biópsias no campo da histologia pode confirmar diretamente a presença da bactéria *M. tuberculosis* nos tecidos afetados, mas seu uso pode ser limitado pela invasividade do procedimento e pela necessidade de análise especializada. **Conclusão:** Enquanto a tuberculose permanece como importante causa de morbimortalidade, especialmente nas nações em desenvolvimento, melhorias no diagnóstico, trazendo precisão e rapidez no mesmo, precisam ser alvo de estudos. Tão importante quanto, é garantir o acesso a essas técnicas no espaço geográfico e também de oferecer treinamento adequado a equipe de saúde.

Palavras-chave: Bacilo de Koch, *Mycobacterium tuberculosis*, Técnicas de Laboratório Clínico.

ABSTRACT

Introduction: *Mycobacterium tuberculosis* is a gram-positive bacillus responsible for tuberculosis (TB) in humans. Although the pulmonary form of the infection is the most common, it can also occur in other organs and systems, characterizing the disseminated form of the disease. Despite efforts to control the epidemiology of the disease, TB remains a significant cause of morbidity and mortality worldwide, especially in developing countries like Brazil. Undiagnosed infected patients are important sources of disease dissemination. Therefore, the diagnosis of symptomatic individuals and those at risk for infection is crucial for the epidemiological control of TB.

Objective: To present the different bacteriological and histopathological tests used in this infection, in its primary or secondary, latent or active form. **Methods:** Narrative review based on articles and guidelines published and available in the Scielo, Medline, and Lilacs databases, aiming to review the tests employed in the laboratory diagnosis of tuberculosis. **Review:** There is a range of techniques available for the diagnosis of tuberculosis, each with its own advantages, disadvantages, and unique characteristics. The classic methods still widely used include direct sputum examination, the tuberculin skin test (TST), and culture. The TST is effective in detecting latent infections, but it is not sufficient to confirm active tuberculosis, while culture, although it is the gold standard for diagnosis, is limited by its processing time. Technological advancements have brought new diagnostic tools such as radiography and computed tomography, which allow direct visualization of the lungs and other potentially affected organs. In addition, molecular tests such as nucleic acid amplification (NAATs) offer quicker and more precise results, but they are more expensive and require specific laboratory infrastructure. Biopsy analysis in the field of histology can directly confirm the presence of the *M. tuberculosis* bacteria in the affected tissues, but its use may be limited by the invasiveness of the procedure and the need for specialized analysis. **Conclusion:** While tuberculosis remains a significant cause of morbidity and mortality, especially in developing nations, improvements in diagnosis, bringing accuracy and speed, need to be the focus of studies. Equally important is ensuring access to these techniques geographically and also providing adequate training to the health team.

Keywords: Koch's bacillus, *Mycobacterium tuberculosis*, Clinical Laboratory Techniques.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 OBJETIVO	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos	6
3 MÉTODOS	7
4 REVISÃO DA LITERATURA	8
4.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
4.2 Testes laboratoriais bacteriológicos	11
4.2.1 Microscopia do esfregaço	14
4.2.2 Cultura	17
4.2.3 Testes moleculares.....	19
4.3 Testes sorológicos	20
4.4 Teste tuberculínico	21
4.5 Diagnóstico histopatológico	22
4.6 Diferenças para o diagnóstico das formas pulmonar e extrapulmonar da TB	23
5 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença humana causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), uma bactéria gram-positiva também conhecida como Bacilo de Koch.¹ A infecção afeta principalmente os pulmões, o que faz da forma pulmonar a apresentação mais comum. Contudo, outros órgãos do sistema respiratório podem ser afetados, assim como o trato gastrointestinal, o sistema linforreticular, a pele, o sistema nervoso central, o sistema músculo-esquelético, o sistema reprodutivo e o fígado.²

Apesar de esforços que culminaram nos avanços da terapia e prevenção da TB nas últimas décadas, esta infecção continua sendo uma das 10 principais causas de morte em todo o mundo. Mais de 9 milhões de novos casos e mais de 1 milhão de mortes ocorrem a cada ano, representando uma enorme carga de morbidade e mortalidade para as nações, especialmente aquelas em desenvolvimento, como o Brasil.¹⁻³

Existem algumas condições que alteram a resposta imune aumentando o risco de infecção e progressão da TB como é o caso da coinfeção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Já no caso de infecção, fatores como diabetes, etilismo, desnutrição e tabagismo que afetam uma ampla parcela da população, podem resultar no pior prognóstico do paciente.⁴

Segundo estudos epidemiológicos de vanguarda realizados, os casos de baciloscopia positiva são mais infecciosos do que os outros.^{5,6} Um paciente com escarro positivo não tratado pode infectar 10 indivíduos por ano, e cada baciloscopia positiva pode levar a dois novos casos de TB, pelo menos um dos quais será infeccioso.^{4,7} Assim sendo, o diagnóstico desta infecção é a pedra angular nas estratégias de controle da doença em nível individual e coletivo.²

Os sinais clínicos mais frequentes que levam à suspeita da infecção por MTB incluem tosse crônica, hemoptise, perda de peso, febre baixa e sudorese noturna para a tuberculose pulmonar. Já a tuberculose secundária difere na apresentação clínica da doença progressiva primária. A reação tecidual e a hipersensibilidade são mais graves, e os pacientes costumam formar cavidades na porção superior dos pulmões.⁸

Além dos indivíduos com suspeitas clínicas, a triagem para diagnosticar a forma latente da doença e a terapia profilática continuam sendo as ferramentas mais

importantes para reduzir o risco de progressão para a doença entre indivíduos de alto risco (contatos próximos, indivíduos infectados pelo HIV, profissionais de saúde, etc.) e devem ser considerados em países endêmicos para reduzir a progressão da infecção para a doença.⁴

Dada a importância da etapa diagnóstica no contexto da TB, a presente revisão tem por objetivo apresentar os diferentes testes bacteriológicos e histopatológicos empregados nesta infecção, em sua forma primária ou secundária, latente ou ativa.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Apresentar os diferentes testes bacteriológicos e histopatológicos empregados nesta infecção, em sua forma primária ou secundária, latente ou ativa.

2.2 Objetivos específicos

- Pontuar aspectos microbiológicos de *M. tuberculosis*;
- Revisar sobre os testes laboratoriais bacteriológicos: microscopia do esfregaço, cultura e testes moleculares;
- Revisar sobre o diagnóstico histopatológico;
- Revisar sobre o teste tuberculínico (*purified protein derivative*, PPD, em inglês);
- Apresentar as diferenças para o diagnóstico das formas pulmonar e extrapulmonar;
- Discutir sobre as dificuldades no diagnóstico da TB.

3 MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na forma de uma revisão narrativa. Esse delineamento trata de produções amplas, apropriadas para descrever e discutir o desenvolvimento ou o "estado da arte" de um determinado assunto, sob ponto de vista teórico ou contextual. Nesse tipo de revisão não há o estabelecimento de um critério rigoroso para estabelecer as fontes de informação utilizadas, a metodologia para busca das referências ou os critérios utilizados na avaliação e seleção dos trabalhos.⁹

Para a realização da presente revisão foram utilizados artigos e diretrizes publicados e disponíveis nas bases de dados Scielo, Medline e Lilacs, com o intuito de revisar sobre os testes empregados no diagnóstico laboratorial da tuberculose. Assim, os termos de busca empregados foram "*Mycobacterium tuberculosis*", "tuberculose" e "diagnóstico", isolados ou combinados, nos idiomas português e inglês. Por se tratar de uma revisão narrativa, onde aspectos históricos podem ser relevantes para se alcançar o estado da arte no tema, não foi delimitado período temporal para a seleção dos estudos.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis é uma bactéria gram-positiva, álcool-ácido resistente, que pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Essa bactéria possui uma parede celular única, composta por uma camada espessa de lipídios, como os ácidos micólicos, que conferem resistência a agentes químicos e físicos. Além disso, a parede celular do MTB contém outros componentes importantes, como a lipoarabinomanana (LAM) e a manose-lipoarabinomanana (ManLAM), que desempenham papéis cruciais na interação com o sistema imunológico do hospedeiro.¹⁰⁻¹²

A capacidade de sobrevivência e persistência do MTB é um aspecto notável dessa bactéria. O MTB possui a capacidade de entrar em um estado de dormência, conhecido como estado latente, no qual a replicação bacteriana é desacelerada e a bactéria se torna resistente aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às terapias antimicrobianas. Durante o estado latente, o MTB pode permanecer viável por longos períodos de tempo, podendo ser reativado e causar doença ativa em momentos de imunossupressão ou outros fatores desencadeantes.¹¹

O MTB é um patógeno bacteriano que afeta tanto humanos quanto animais. Altamente prevalente em países endêmicos de tuberculose, tem a capacidade de, como mencionado, resistir e se adaptar às terapias antituberculosas.¹⁰ A disseminação do patógeno ocorre principalmente através do contato com as secreções respiratórias de indivíduos infectados, como a tosse ou espirro. Além disso, pode contaminar o solo e a água através de animais infectados, como o gado, ampliando ainda mais o seu alcance.¹¹

A patogênese da tuberculose envolve uma interação complexa entre o MTB e o sistema imunológico do hospedeiro. Após a inalação das bactérias, o MTB é fagocitado por células do sistema imunológico, como os macrófagos. No entanto, o MTB possui mecanismos de evasão que permitem sua sobrevivência dentro dos macrófagos, evitando a destruição pelo sistema imunológico. Essa interação entre o patógeno e as células do hospedeiro desencadeia uma resposta inflamatória, resultando na formação de granulomas, estruturas bastante características da tuberculose.¹⁰

Além disso, a virulência e o perfil genético das diferentes cepas de MTB também são objetos de estudo. Por exemplo, a cepa Rostov, pertencente ao genótipo Beijing e é associada à tuberculose extensivamente resistente a drogas. Os resultados de experimentos com essa linhagem, indicaram uma menor ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, em comparação com a cepa H37Rv.¹²

Assim, a resistência do MTB às drogas antituberculosas é um desafio significativo no tratamento da tuberculose. O MTB possui mecanismos intrínsecos de resistência, como a presença de enzimas modificadas que inativam os antimicrobianos, bem como a capacidade de formar biofilmes, que protegem as bactérias da ação dos medicamentos. Além disso, pode adquirir resistência a drogas por meio de mutações genéticas ou transferência horizontal de genes, o que contribui para a disseminação de cepas resistentes e dificulta o controle da doença.¹²

Imagens da estrutura da bactéria e seu aspecto em meio de cultura podem ser vistas na Figura 1.

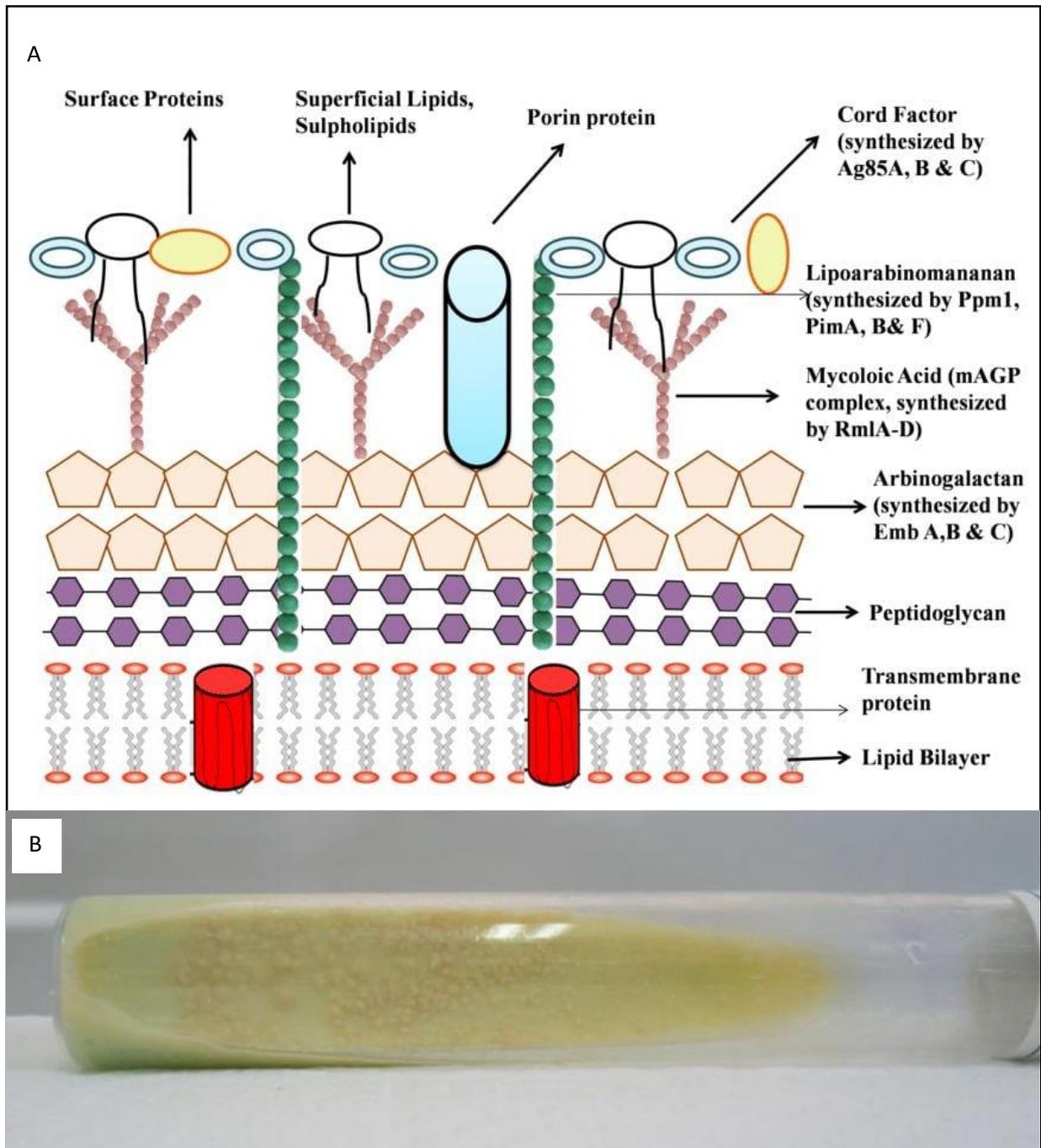


Figura 1: Aspectos de *Mycobacterium tuberculosis*. A) Estrutura da membrana da bactéria. B) *M. tuberculosis* em meio de cultura Lowenstein Jensen.

Fonte: Heemskerk D. et al, 2015.¹³

4.2 Testes laboratoriais bacteriológicos

A necessidade de aprimorar os métodos de diagnóstico da tuberculose, especialmente para infecções extrapulmonares, é um tema que ainda no século XXI continua sendo pauta na literatura científica. Atualmente, os métodos de diagnóstico são limitados e muitas vezes ineficazes para essas infecções. Moule e Cirilo destacaram a importância de identificar fatores de disseminação bacteriana e desenvolver novas abordagens de diagnóstico, como a identificação de marcadores moleculares específicos e o uso de técnicas de sequenciamento genômico.¹¹

No mesmo sentido, Zhang et al.¹² abordaram sobre a dificuldade no diagnóstico precoce da tuberculose extrapulmonar, que muitas vezes é confundida com outras doenças devido a sintomas atípicos. Os autores mencionaram a necessidade de métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos, como a detecção de RNA do MTB em amostras de escarro. Além disso, discutiram sobre a importância da avaliação da viabilidade microbiana para determinar a eficácia do tratamento.

Heemskerk et al.¹³ levantaram a questão sobre a importância do diagnóstico precoce da tuberculose também em animais, especialmente em bovinos. Mais uma vez, mencionaram sobre a necessidade de métodos de diagnóstico eficazes para identificar a infecção por *Mycobacterium bovis*, uma espécie relacionada ao MTB. O uso de técnicas de genotipagem e sequenciamento genômico é mencionado como uma abordagem promissora para prever a suscetibilidade e resistência a drogas.

Se o diagnóstico diferencial de um paciente incluir tuberculose, os principais testes para a detecção do patógeno em escarro e amostras de tecido são cultura (o padrão-ouro), microscopia e testes de amplificação de ácidos nucleicos. Estudos de imagem também são usados para diagnóstico e acompanhamento. O tratamento padrão consiste em uma combinação de isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, seguida de uma combinação apenas de isoniazida e rifampicina. Testes laboratoriais para identificar resistência e seus mecanismos também são de grande relevância.¹⁴

Nos quadros a seguir (Quadros 1 e 2), está descrita uma síntese dos testes laboratoriais empregados no diagnóstico da tuberculose e nas seções seguintes, eles serão discutidos de modo mais aprofundado.

Quadro 1: Testes diagnósticos relevantes utilizados para tuberculose ativa.

<i>Testes diagnósticos para tuberculose ativa</i>		
tipo de teste	Principais testes comerciais	Recomendação de política da OMS
Microscopia de esfregaço	Não comercial	Recomendado
microscopia LED		Recomendado
Amplificação de ácido nucleico automatizada em tempo real	GeneXpert MTB/RIF	Recomendado
Kit de teste de amplificação isotérmica mediada por loop para TB	ensaio LAMP	Não recomendado. Em desenvolvimento
Tecnologia de tira de especificação rápida		Recomendado
Testes sorodiagnósticos	Mais de 20 variantes comerciais	Não recomendado
Ensaio de liberação de interferon-gama	Teste QuantiFERON-TB Gold In-Tube, teste T-Spot	Não recomendado para diagnóstico de TB ativa
<i>Testes de sensibilidade a drogas</i>		
tipo de teste	Principais testes comerciais	Recomendação de política da OMS
DST fenotípica em meio sólido ou líquido	Não comercial	Recomendado para USO
Cultura líquida comercial e sistemas DST	Bactec MGIT	Recomendado para USO
Ensaio de sonda de linha de primeira linha	MTBDR-Plus; INNO LiPA-RIF TB	Recomendado para USO em amostras com esfregaço positivo
Ensaio de sonda de linha de segunda linha	MTBDRsl	Ainda não recomendado devido a evidências insuficientes
Amplificação de ácido nucleico automatizada em tempo real	GeneXpert MTBRIF	Recomendado para USO
Suscetibilidade a drogas de observação microscópica (MODS)	Não comercial	Recomendado para USO
Indicador redox colométrico (CRI)	Não comercial	Ainda não recomendado devido a evidências insuficientes
Ensaio de nitrato redutase (NRA)	Não comercial	Ainda não recomendado devido a evidências insuficientes
Ensaio de fagos	FASTplaque, ensaio de fago repórter de luciferase	Não recomendado
sequenciamento	Não comercial	Nenhuma política

Fonte: Adaptado de Heemskerk D, et al. (2015)¹⁵

Quadro 2: Classificação dos testes diagnósticos segundo suas vantagens e desvantagens.

<i>Testes diagnósticos para tuberculose ativa</i>		
tipo de teste	Vantagens	Limitações
Microscopia de esfregaço	Barato, simples, rápido, específico	Não é possível diferenciar MNT ^a e <i>M. tuberculosis</i>
microscopia LED	Barato, simples, rápido	Não é possível diferenciar MNT ^a e <i>M. tuberculosis</i>
Amplificação de ácido nucleico automatizada em tempo real	Rápido (2 h para o resultado). Detecta TB com baciloscopia negativa. Também detecta resistência RIF	Custo mais alto que o esfregaço
Kit de teste de amplificação isotérmica mediada por loop para TB	Rápido, simples	Interpretação subjetiva e especificidade pobre
Tecnologia de tira de especificação rápida	Para diferenciação rápida de MNT ^a e <i>M. tuberculosis</i>	Caro
Testes sorológicos		Baixa sensibilidade e especificidade
Ensaio de liberação de interferon-gama		Complexo para executar e resultados indeterminados relativamente comuns
<i>Testes de sensibilidade a drogas</i>		
tipo de teste	Vantagens	Limitações
DST fenotípica em meio sólido ou líquido	Drogas testadas	
Cultura líquida comercial e sistemas DST	Todas as drogas ^b	Tempo extremamente longo para o resultado (6-12 semanas)
Ensaio de sonda de linha de primeira linha	STR, INH, RIF, EMB, PZA	Caro
Ensaio de sonda de linha de segunda linha	RIF, INH	Caro
	Fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e EMB	Baixa sensibilidade para crambuto
Amplificação de ácido nucleico automatizada em tempo real	RIF	As reduções de preço dos cartuchos estão disponíveis apenas em países de renda média baixa
Suscetibilidade a drogas de observação microscópica (MODS)	RIF, INH	Interpretação subjetiva. Leitura manual de placas trabalhosa ⁵
Indicador redox colométrico (CRI)	RIF, INH	interpretação subjetiva
Ensaio de nitrato redutase (NRA)	RIF, INH	interpretação subjetiva
Ensaio de fagos	RIF, INH	Pouca especificidade
sequenciamento	Depende das regiões gênicas sequenciadas	Requer interpretação especializada. Geralmente não disponível fora dos centros de pesquisa
	Podem fornecer informações sobre vários medicamentos simultaneamente	

Fonte: Adaptado de Heemskerk D, et al. (2015)¹⁵

4.2.1 Microscopia do esfregaço

A confirmação da tuberculose ainda depende da identificação ou isolamento do bacilo de uma amostra clínica. Isso pode ser obtido por baciloscopia para bacilos ácido-resistentes (BAAR), cultura micobacteriana ou testes de amplificação de ácido nucleico (NAAT). A amostra apropriada dependerá do local suspeito da doença. A qualidade da amostra pode interferir na conclusão de um resultado positivo, portanto, deve-se instruir cuidadosamente o paciente no momento da coleta de uma amostra de escarro. As crianças muitas vezes são incapazes de produzir escarro e, em crianças pequenas, o aspirado gástrico geralmente é necessário.¹⁵

Existem 4 formas principais para a coleta de escarro descritas a seguir. A tosse é o método mais comum e amplamente utilizado. Um profissional de saúde usando equipamento de proteção individual adequado deve supervisionar e orientar este processo. O paciente precisa ser orientado para que haja a coleta apenas de escarro que deve ser retirado dos pulmões. Muco do nariz e a saliva da boca não são amostras apropriadas. Uma segunda possibilidade é a indução de escarro, sendo usada para pacientes que não conseguem expectorar escarro apenas tossindo.¹⁶ A tosse produtiva profunda pode ser induzida pela inalação de solução salina hipertônica morna em aerossol (3 a 5%). Este escarro é mais fino em consistência e pode se assemelhar a saliva. Deve-se ter cuidado ao rotular a amostra como “escarro induzido” para que não seja descartada devido à sua consistência fina.¹⁷ A broncoscopia é um procedimento invasivo usado para visualizar as passagens respiratórias dos pulmões. Este procedimento pode ser usado para extrair o escarro por meio de lavagem brônquica, escovação e/ou biópsia. Tal procedimento não deve ser utilizado como substituto da coleta de escarro, mas sim como investigação complementar ao diagnóstico.¹⁶ Por fim, a aspiração gástrica pode ser utilizada para obter escarro previamente expectorado e deglutido pelo paciente. Este procedimento é particularmente útil em crianças. Para obter uma amostra melhor, a aspiração gástrica deve ser feita no início da manhã, quando o paciente não comeu nada.¹⁸

As amostras de escarro necessitam ser recolhidas em recipientes adequados. Frequentemente, utiliza-se um recipiente de plástico transparente de 50 ml com tampa de rosca para assegurar um armazenamento seguro. A clareza do recipiente facilita a inspeção visual da amostra para verificar sua consistência e qualidade. É imprescindível rotular corretamente a amostra com o nome do paciente e a data de

coleta. A amostra recolhida precisa ser mantida entre 2 a 8°C até seu transporte para o laboratório. Segundo os Centros Americanos de Controle e Prevenção de Doenças, para o diagnóstico, é requerida a coleta de ao menos 3 amostras sucessivas de escarro, cada uma coletada em intervalos de 8 a 24 horas, incluindo pelo menos uma amostra de expectoração matutina. Em países com um programa de avaliação externa da qualidade (EQA) bem estruturado, mas com limitações de recursos humanos, a Organização Mundial da Saúde aconselha o uso de duas amostras para o diagnóstico. Esse procedimento visa facilitar o diagnóstico precoce ou “no mesmo dia” de pacientes com tuberculose da comunidade.¹⁶

O diagnóstico para a maioria dos pacientes em todo o mundo com suspeita de TB ainda é feito por baciloscopia de escarro para BAAR. O teste, desenvolvido há 100 anos por Franz Ziehl e Frederick Neelsen, é barato, simples, rápido e específico, mas com o inconveniente de ser positivo apenas em cerca de metade dos pacientes com tuberculose ativa. O esfregaço de Ziehl-Neelsen explora a propriedade ácido-resistente das micobactérias, corando os bacilos com carbolfucsina, usando calor suave para facilitar a penetração do corante e, em seguida, usando uma solução ácida descolorante, que não consegue penetrar nas micobactérias, deixando-as coradas de vermelho enquanto outros bacilos são descoloridos. A lâmina geralmente é contrastada com azul de metileno para melhorar a visualização das micobactérias.^{16,19}

A coloração Kinyoun é um método alternativo de coloração a frio. A sensibilidade do teste é substancialmente menor em crianças e pacientes com HIV. Além disso, o teste não é específico para *M. tuberculosis*, detectando todos os bacilos ácido-resistentes. A sensibilidade pode ser aumentada pela concentração das amostras antes da microscopia, geralmente por centrifugação ou filtração, mas a coloração direta (não concentrada) de ZN é a metodologia mais amplamente aplicada devido às limitações de recursos.¹⁶

A etapa de análise dos esfregaços é fundamental na microscopia de escarro (Figura 2). O manual da Global Laboratory Initiative (GLI) estabelece orientações para a leitura, o registro e a emissão de resultados para os métodos Ziehl-Neelsen. A quantidade sugerida de campos visuais que devem ser examinados é de 150 para um esfregaço de tamanho 3 cm x 2 cm e 100 para um de tamanho 2 cm x 1 cm. Os resultados da microscopia BAAR podem ser relatados de acordo com os seguintes padrões da Organização Mundial da Saúde e da União Internacional Contra

Tuberculose e Doenças Pulmonares (OMS-IUTLD) para o Método Ziehl-Neelsen (via microscopia de campo claro/luz)²¹:

- Nenhum BAAR observado – Relatar como "0". Isso indica que nenhum BAAR foi identificado em 2 comprimentos (ou seja, 300 campos visuais), gerando um resultado "negativo".

- 1-9 BAAR em 1 comprimento - Registrar o número real de BAAR observado (por exemplo, +1, +2, +9). Lembre-se de que o sinal de mais deve preceder o número. Isso também é conhecido como um resultado positivo escasso.

- 10-99 BAAR em 1 comprimento - Relatar como "1+". O sinal de mais deve seguir o número. Este é um resultado positivo.

- 1-10 BAAR por campo em pelo menos 50 campos visuais - Relatar como "2+". O sinal de mais deve seguir o número. Este é um resultado positivo.

- Mais de 10 BAAR por campo em pelo menos 20 campos visuais - Relatar como "3+". O sinal de mais deve seguir o número. Este é um resultado positivo e é altamente infeccioso.

Assim, a baciloscopia pode ser sintetizada como um teste rápido e de baixo custo, porém de sensibilidade limitada, principalmente em casos de tuberculose extrapulmonar. Portanto, embora seja um teste útil, é importante considerar outros métodos diagnósticos, como a cultura de micobactérias, para obter resultados mais precisos.²⁰

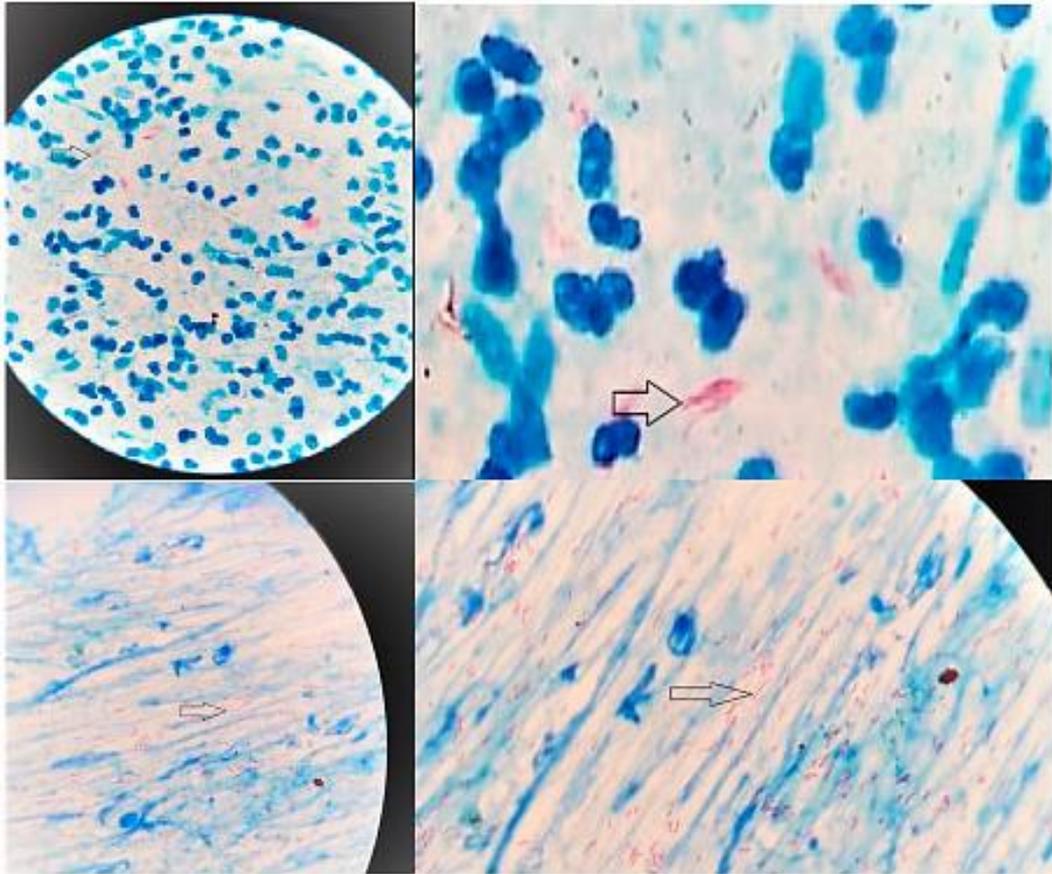


Figura 2: Imagem de microscopia óptica de lâmina de "escarro" corada pela coloração de Ziehl-Neelsen (aumento de 100x).

Fonte: Da Costa, Silva e Gonçalves (2018)²²

4.2.2 Cultura

A cultura do patógeno é um teste laboratorial que consiste no isolamento e crescimento de micobactérias presentes em amostras clínicas, como escarro, em meios de cultura específicos. Esse teste é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de tuberculose, pois permite a identificação precisa da espécie de micobactéria e a realização de testes de sensibilidade aos medicamentos. No entanto, é demorado, podendo levar semanas para obter resultados.²⁰

Assim, esse método de detecção tem alta especificidade e sensibilidade. Mesmo quando a baciloscopia é negativa, a cultura do escarro pode aumentar a positividade em até 30% e por isso, como dito, é vista como o padrão-ouro para diagnóstico de TB. Com a alta qualidade técnica, é possível detectar de 10 a 100 bacilos cultiváveis por mL de escarro. Os meios de cultura mais comuns são os sólidos à base de ovo, LJ e

O-K, que possuem baixo custo e menor índice de contaminação. Contudo, seu tempo de crescimento varia de 15 a 30 dias, podendo alcançar até oito semanas. Existem também métodos que utilizam meios de cultura líquidos, com resultados disponíveis entre 5 e 13 dias. A cultura em meio líquido é indicada para laboratórios que processam um grande volume de amostras, como hospitais e Laboratórios de Referência.²²

As colônias que crescem em meios sólidos são analisadas micro e macroscopicamente para confirmação. Na macroscopia, observam-se colônias com diferentes morfologias e pigmentações. Na microscopia, um esfregaço da colônia é corado pelo método de ZN para verificar a pureza da cultura e confirmar a presença de BAAR. Normalmente, as micobactérias aparecem como bacilos curvos ou retos, com as espécies do complexo *M. tuberculosis* mostrando um arranjo característico de bacilos em cordões paralelos. A maioria das Micobactérias não-tuberculosas (MNT) não forma cordão, apresentando bacilos com aspecto microscópico diferente.^{23,24} A cultura também é necessária para confirmar a suscetibilidade aos medicamentos, particularmente para medicamentos de segunda linha em casos de multirresistência (TB MDR).¹⁶

As amostras do trato respiratório inferior geralmente possuem uma microbiota bacteriana associada além das células epiteliais e polimorfonucleares. Quando se realiza a cultura para o diagnóstico da TB pulmonar, é crucial eliminar essa microbiota associada, pois ela cresce mais rápido, contamina o meio de cultura e impede o crescimento e identificação das micobactérias, dificultando o diagnóstico da doença. Isso é feito submetendo o material biológico a um processo de descontaminação, que purifica a amostra antes de semear em meios específicos.²⁵

Os principais métodos de preparação e cultivo de micobactérias consistem em 5 etapas: pré-tratamento, fluidificação e descontaminação, semeadura, incubação e leitura do resultado. Na etapa de fluidificação e descontaminação, são utilizados agentes químicos para homogeneizar a amostra clínica e eliminar outros microrganismos, preservando as micobactérias. A eliminação desses microrganismos permite o crescimento das micobactérias sem competição pelos nutrientes contidos nos meios de cultura. Na etapa de fluidificação, os agentes fluidificantes mais comuns incluem o hidróxido de sódio (NaOH), N-acetil-L-cisteína (NALC) e ácido oxálico. A semeadura em meio de cultura permite que as micobactérias na amostra entrem em contato com as substâncias nutritivas dos meios de cultivo. Já na fase de incubação,

fornece-se a temperatura ideal para a multiplicação das micobactérias, Por fim, na etapa de leitura dos resultados, verifica-se a presença de colônias e/ou contaminação como indicação de presença de micobactérias e registra-se sua ocorrência.²⁵

Para execução desse teste, deve-se oferecer treinamento significativo, infraestrutura, controle de infecção rigoroso e garantia de qualidade contínua.¹⁶

A imagem da cultura pode ser vista na Figura 1B.

4.2.3 Testes moleculares

Os testes moleculares são métodos de diagnóstico laboratorial que utilizam técnicas de biologia molecular para detectar a presença do MTB e identificar resistência a medicamentos. Avanços nos métodos moleculares para detecção de MTB reduziram o tempo de diagnóstico para alguns dias, enquanto o diagnóstico por sistemas de cultura convencionais precisa de várias semanas.²⁶

Como o diagnóstico bacteriológico convencional da TB tem várias limitações, surgiu uma alternativa em potencial, o teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT) ou Xpert MTB/RIF, que é capaz de detectar o DNA do patógeno e identificar resistência à rifampicina em aproximadamente duas horas, sendo indicado para o diagnóstico rápido de tuberculose em casos suspeitos, inclusive em pacientes com HIV/AIDS. No Brasil, esse teste é conhecido como teste molecular rápido para tuberculose (RMT-TB) e é utilizado em diferentes tipos de amostras, como escarro, lavado broncoalveolar e líquido gástrico. Além disso, foi desenvolvida uma versão aprimorada desse teste, chamada Xpert MTB/RIF Ultra, que apresenta maior sensibilidade, especialmente em amostras com baixa carga bacteriana.²⁰

Os sistemas NAAT, com tempos de resposta rápidos, facilitam o teste e o início do tratamento na mesma visita e, portanto, a perda de casos de acompanhamento pode ser reduzida. A maioria dos ensaios NAAT detecta o elemento de inserção micobacteriano IS6110 para a identificação dos organismos do complexo MTB. O NAAT detecta RNA ou DNA ribossômico de MTB diretamente de amostras de escarro, tanto bacilos ácido-resistentes com esfregaço positivo quanto negativo. O NAAT mostrou sensibilidade muito alta em pacientes com baciloscopia positiva e em torno de 61 a 76% de sensibilidade em pacientes com baciloscopia negativa. Atualmente, o NAAT aprovado pela OMS é o ensaio Xpert/RIF MTB. Em locais onde a taxa de culturas positivas para TB é baixa, pode ser mais eficiente limitar o NAAT aos casos

com baciloscopia positiva; por outro lado, em locais onde os casos de TB são altos, um NAAT deve ser usado em casos com baciloscopia negativa.²⁷

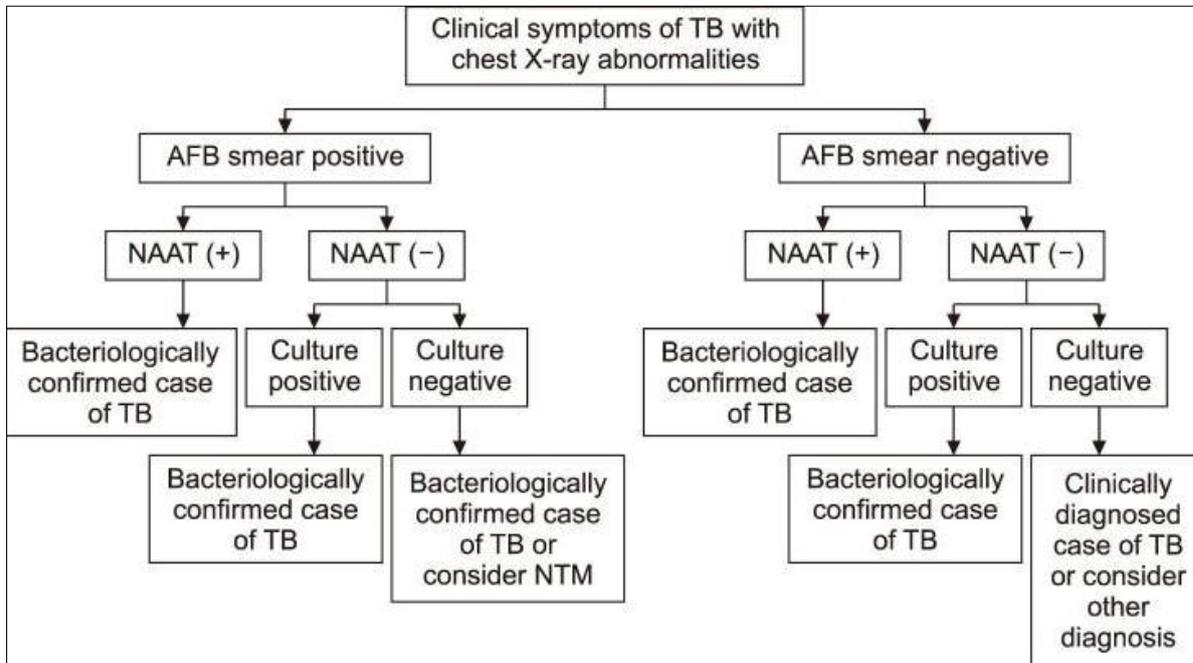


Figura 3: Fluxograma identificando a importância do teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) no algoritmo de diagnóstico de TB. TB: tuberculose, NAAT: teste de amplificação de ácido nucléico, NTM: micobactéria não tuberculosa.

Fonte: Nurwidya et al., (2018)²⁷

Outro teste molecular é o *line probe assay*, que além de identificar o *M. tuberculosis*, também pode detectar resistência a rifampicina, isoniazida, fluoroquinolonas e drogas injetáveis. Esses testes moleculares têm se mostrado eficazes no diagnóstico rápido e preciso da tuberculose, contribuindo para o início precoce do tratamento adequado.²⁰ A quantificação da carga bacilar tem importante papel prognóstico em pacientes com TB e sistemas como esse têm essa capacidade.²⁷

4.3 Testes sorológicos

Os exames sorológicos de tuberculose são frequentemente aplicados em países carentes de recursos mais especializados como os testes moleculares. Senosaputra et al. identificaram que os níveis plasmáticos de anticorpos anti- α -cristalina (ACR),

anti-lipoarabinomanano, anti-trealose 6,6'-dimicolato e anti-antígeno glicolípido tuberculoso se apresentaram mais elevados em pacientes com tuberculose ativa do que em indivíduos com infecção latente por tuberculose e em participantes do grupo controle.²⁸ Outro grupo de pesquisadores observaram uma variada resposta de anticorpos IgG contra cinco antígenos lipídicos: fator corda (trealose 6,6'-dimicolato) (TDM-T), monoacil fosfatidilinositol dimanosídeo (Ac-PIM2), monomicolato de trealose isolado de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (TMM-T), monomicolato de trealose (TMM-M) e GPL- core deComplexo *Mycobacterium avium* (MAC).²⁹

Todavia, uma revisão sistemática a respeito da precisão diagnóstica dos testes sorológicos indica que esses exames demonstraram imprecisão tanto para a TB pulmonar quanto para a extrapulmonar. O exame sorológico de TB possui limitações para definir se uma pessoa teve uma infecção de TB prévia e, conseqüentemente, não é capaz de confirmar se o indivíduo tem uma infecção de TB ativa. Além disso, a OMS recomenda expressamente que os testes sorológicos comerciais não sejam utilizados para o diagnóstico de TB pulmonar e extrapulmonar.^{30,31}

4.4 Teste tuberculínico

O Teste Tuberculínico (TT) é uma das ferramentas usadas para a identificação da tuberculose em estado latente, complementando o diagnóstico da doença em sua forma ativa. A resposta ao TT ajuda a definir a estratégia de tratamento para a tuberculose latente.³²

Esse exame é feito pela técnica de Mantoux, que prescreve a aplicação de 0,1 mL (2 UT) de PPD RT23 na parte frontal do antebraço, com a leitura sendo feita entre 48 e 72 horas após a aplicação. Se o teste resultar em uma área de endurecimento de 10 mm ou mais, o indivíduo é considerado infectado. Entretanto, para pessoas imunodeprimidas, o limiar estabelecido é de 5 mm.³²

É importante destacar que um teste PPD positivo não indica necessariamente a presença de tuberculose ativa. Pode refletir uma infecção latente (ou seja, o indivíduo foi infectado pelo MTB, mas a doença não está ativa) ou uma infecção passada. Além disso, a vacinação prévia com a vacina BCG pode levar a resultados falso-positivos, uma vez que esta vacina é derivada de uma cepa de *Mycobacterium bovis*, que é semelhante ao *M. tuberculosis*.³³

Além disso, existem limitações significativas no uso do teste PPD. Ele pode produzir resultados falso-negativos em pacientes imunocomprometidos e em indivíduos que foram recentemente infectados com tuberculose. Os testes podem ser afetados por variáveis, como o manuseio e armazenamento do PPD, a técnica de aplicação e a interpretação dos resultados.³³

Pesquisas operacionais em vários estados brasileiros indicaram que a estrutura dos serviços de saúde pode afetar o acesso ao diagnóstico, o tempo para o diagnóstico, a aderência ao tratamento e a retenção do paciente no programa. Mais especificamente, no caso do teste em pauta, a ausência de padronização das seringas para o TT pode prejudicar sua realização adequada devido à imprecisão da dose sugerida, o que pode levar a um aumento no número de testes falsamente negativos.³⁴

Estima-se que as perdas de PPD nos frascos sejam de 50%; contudo, essa perda pode ser minimizada quando uma seringa padronizada é utilizada e quando os profissionais são capacitados para o manejo correto do produto. A demanda baixa contribui para as perdas devido ao vencimento da validade, à contaminação ou até mesmo à manutenção de um frasco aberto por mais de 30 dias, que leva à perda de potência e, conseqüentemente, ao aumento do número de resultados falsamente negativos.³²

Assim, em 2009, houve mudanças na distribuição do PPD, que passou a ser fornecido em frascos de 1,5 mL pelo Ministério da Saúde. É reconhecida a influência do tamanho do frasco de PPD nos resultados do TT devido à adsorção do PPD à parede do frasco em função da relação do volume do produto com a superfície interna. Por isso, frascos de menor volume (1,5 mL) podem gerar resultados com menos endureção se comparados àqueles provenientes de frascos de PPD com volume de 5 mL.³⁴

É essencial incluir o cálculo da proporção de casos de infecção latente e do tratamento de tuberculose latente como um indicador obrigatório, o que incentivaria a reestruturação dos serviços para ampliar o uso do TT.³²

4.5 Diagnóstico histopatológico

O diagnóstico histológico da tuberculose é frequentemente usado quando os métodos convencionais, como a cultura ou o exame direto do escarro, não são

conclusivos ou quando a apresentação da doença é atípica. Através deste método, a presença da bactéria MTB pode ser identificada diretamente nos tecidos afetados. O processo começa com a obtenção de uma amostra de tecido, geralmente por biópsia ou punção, do local suspeito de infecção. Isso pode incluir uma variedade de locais, como os pulmões, gânglios linfáticos, ossos, pele ou outros órgãos, dependendo do local da doença. A amostra de tecido é então processada e examinada microscopicamente.³⁵

Existem várias características histológicas que são classicamente associadas à tuberculose. A mais notável é a formação de granulomas caseosos, que são aglomerados de células imunes, particularmente macrófagos e linfócitos, cercado um centro necrótico ou caseoso. Esses granulomas são uma resposta imunológica à infecção e são uma tentativa do corpo de isolar a bactéria. Outra característica comum é a presença de células gigantes de Langhans, que são macrófagos fundidos com vários núcleos em uma configuração semelhante a uma ferradura.³⁶

Relatou-se que a sensibilidade das características histológicas varia de 59 a 88% para TB linfonodal (biópsia excisional) contra um padrão de referência composto. O exame histológico apresenta limitações no diagnóstico de TB; a resposta granulomatosa pode não ocorrer em indivíduos imunocomprometidos com TB; além disso, respostas granulomatosas também são observadas em condições infecciosas, exceto tuberculose, autoimunes, tóxicas, alérgicas e neoplásicas 4 – 6. Para o diagnóstico bacteriológico da EPTB, a microscopia de bacilos ácido-resistentes (BAAR) tem valor limitado devido à sua baixa sensibilidade.³⁵

4.6 Diferenças para o diagnóstico das formas pulmonar e extrapulmonar da TB

A forma pulmonar da tuberculose é a mais comum e ocorre quando a bactéria infecta os pulmões. Os sintomas mais frequentes incluem tosse persistente, febre, sudorese noturna, perda de peso e falta de apetite. Para o diagnóstico da forma pulmonar, os exames mais usados incluem a baciloscopia do escarro e a radiografia de tórax.²

A radiologia é um método de diagnóstico comumente usado que, infelizmente, possui algumas desvantagens significativas, como a falta de equipamento de radiografia em muitas unidades de saúde e a natureza não específica das imagens da tuberculose na radiografia convencional. No entanto, com o surgimento da tomografia

computadorizada de alta resolução, essa última limitação tornou-se menos relevante, uma vez que essa técnica de imagem permite um diagnóstico de tuberculose com maior grau de confiança.³⁷

A avaliação deve ser instaurada em qualquer indivíduo apresentando tosse por mais de três semanas, acompanhada de sintomas adicionais como febre, suores noturnos, hemoptise ou perda de peso. Além disso, deve-se iniciar uma investigação em grupos de alto risco que apresentem enfermidades prolongadas sem explicação. Tais grupos englobam pacientes HIV positivos, indivíduos recentemente expostos a um caso de tuberculose ativa, pessoas de baixa condição socioeconômica, portadores de doenças crônicas (como diabetes, doença renal crônica, câncer ou imunossupressão) e usuários de drogas injetáveis.³⁸

Quando a imagem na radiografia é indicativa de infecção, devem ser recolhidas e enviadas para análise três amostras de escarro, as quais passarão por uma coloração para BAAR, e uma amostra deve ser testada com NAAT, quando disponível. Se tanto BAAR quanto o NAAT retornarem positivos, é provável a presença de tuberculose e o tratamento deve ser iniciado. O TT e o ensaio de liberação de interferon-gama (IGRA) podem ser acrescentados à investigação, pois reforçam o diagnóstico. Entretanto, resultados negativos não descartam a infecção. No caso de resultados inconclusivos, pode-se considerar uma amostra de broncoscopia para biópsia pulmonar.^{38,39}

A forma extrapulmonar da tuberculose ocorre quando a bactéria infecta outras partes do corpo, como ossos, rins, linfonodos, entre outros. Os sintomas podem variar de acordo com o local afetado, mas incluem dor, inchaço, febre e perda de peso. O diagnóstico da forma extrapulmonar pode ser mais difícil, pois os sintomas são menos específicos e os exames precisam ser direcionados para a região do corpo afetada. Alguns dos exames utilizados podem incluir a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a biópsia.³

O diagnóstico dessa forma de TB pode ser particularmente difícil e, muitas vezes, é baseado apenas em sinais e sintomas clínicos. A confirmação bacteriológica de geralmente requer coleta invasiva de amostra por biópsia ou aspiração com agulha fina seguida do uso de testes diagnósticos adequados, como BAAR, cultura e NAAT. Diagnósticos alternativos como Nocardia, doença micobacteriana não tuberculosa, doenças fúngicas e malignidade devem ser lembrados e descartados durante o

acompanhamento do paciente se a doença progredir ou a resposta ao tratamento não for satisfatória.⁴⁰

5 CONCLUSÃO

Com a realização do presente trabalho de revisão sobre os métodos de diagnóstico utilizados para a tuberculose, pode-se concluir que existe uma variedade de técnicas disponíveis, cada uma com suas próprias vantagens, desvantagens e especificidades.

O exame direto do escarro, o teste PPD e a cultura são métodos de diagnóstico clássicos e ainda muito utilizados. A eficácia do teste PPD na identificação de infecções latentes de tuberculose é amplamente reconhecida, embora não seja suficiente por si só para confirmar um diagnóstico de tuberculose ativa. A cultura continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico definitivo, embora seu tempo de processamento possa ser uma limitação.

Os avanços tecnológicos proporcionaram novas ferramentas para o diagnóstico de tuberculose, como a radiografia e a tomografia computadorizada, que permitem a visualização do estado dos pulmões e outros órgãos afetados. Além disso, a utilização de testes moleculares, como a amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), oferece resultados mais rápidos e precisos, embora sejam mais custosos e exijam infraestrutura laboratorial adequada.

No campo da histologia, a análise de biópsias tem o potencial de confirmar a presença da bactéria *M. tuberculosis* diretamente nos tecidos afetados. No entanto, sua invasividade e a necessidade de análise especializada podem limitar seu uso.

Em suma, a escolha do método de diagnóstico deve ser baseada em uma série de fatores, incluindo a apresentação clínica do paciente, os recursos disponíveis, a localização da possível infecção e a necessidade de resultados rápidos. Importante destacar que a combinação de diferentes métodos diagnósticos pode maximizar a precisão e confiabilidade do diagnóstico de tuberculose. Finalmente, ressalta-se a importância de contínuas pesquisas para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos, acessíveis e rápidos para combater eficazmente a tuberculose, que ainda representa um sério desafio de saúde pública global. Tão importante quanto, é garantir o acesso a essas técnicas no espaço geográfico e também de oferecer treinamento adequado a equipe de saúde.

REFERÊNCIAS

1. Cook GM, Berney M, Gebhard S, et al. Physiology of mycobacteria. *Adv Microb Physiol.* 2009;55:81-319.
2. Terracciano E, et al. Tuberculosi patologia sempre attuale e difficile da prevenire [Tuberculosis: an ever present disease but difficult to prevent]. *Ig Sanita Pubbl.* 2020;76(1):59-66.
3. Fukunaga R, et al. Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Meeting Global Targets - Worldwide, 2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021;70(12):427-430.
4. Narasimhan P, et al. Risk factors for tuberculosis. *Pulm Med.* 2013;2013:828939.
5. McPhendran FM, Opie EL. The spread of Tuberculosis in families. *American Journal of Epidemiology.* 1935;22(3):565–643.
6. Shaw JB, Wynn-Williams N. Infectivity of pulmonary tuberculosis in relation to sputum status. *American Review of Tuberculosis.* 1954;69(5):724–732
7. Maher D. The natural history of Mycobacterium tuberculosis infection in adults. In: Schaaf HS, Zumla A, editors. *Tuberculosis: A Comprehensive Clinical Reference.* Elsevier Health Sciences; 2009;129–132.
8. Natarajan A, et al. A systemic review on tuberculosis. *Indian J Tuberc.* 2020 Jul;67(3):295-311.
9. Bernardo WM, Nobre MRC, Jatene FB. A prática clínica baseada em evidências. Parte II: buscando as evidências em fontes de informação. *Rev Assoc Med Bras.* 2004; 50(1):1-9.
10. Miggiano, R, Rizzi M, Ferraris DM. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis, infection prevention and treatment. *Pathogens.* 2020; 9(5), 385.
11. Moule MG, Cirillo JD. Mycobacterium tuberculosis dissemination plays a critical role in pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology,* 2020; 10, 65.
12. Zhang ., et al. The impact of Mycobacterium tuberculosis complex in the environment on one health approach. *Frontiers in Public Health.* 2022; 10, 994745.
13. Heemskerk D, et al. *Tuberculosis in Adults and Children.* London: Springer; 2015. Image 1.2, Mycobacterium tuberculosis colonies on solid Lowenstein Jensen medium (courtesy of Dr. Dang Thi Minh Ha) Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK344405/figure/ft605814_ch1.F3/
14. Suárez I, et al. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116(43):729-735. doi: 10.3238/arztebl.2019.0729. PMID: 31755407.
15. Heemskerk D, Caws M, Marais B, et al. *Tuberculose em Adultos e Crianças.* Londres: Springer; 2015. Capítulo 4, Diagnóstico.
16. Bayot ML, Mirza TM, Sharma S. Acid Fast Bacteria. [Updated 2022 Aug 8]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537121>
17. Ugarte-Gil C, et al. O escarro induzido é seguro e bem tolerado para o diagnóstico de TB em um ambiente de cuidados primários com poucos recursos. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 março; 92 (3):633-635.
18. Zar HJ, et al. Indução de escarro para o diagnóstico de tuberculose pulmonar em lactentes e crianças pequenas em um ambiente urbano na África do Sul. *Arch Dis Child.* 2000; 82 (4):305-8.

19. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle*. 1970 Jun;51(2):196-206.
20. Silva DR, et al. Diagnosis of tuberculosis: a consensus statement from the Brazilian Thoracic Association. *J Bras Pneumol*. 2021 May 17;47(2):e20210054.
21. Angra P, et al. Read the new microscopy handbook: even the Ziehl-Neelsen technique has changed. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016 Apr;20(4):567.
22. da Costa RR, Silva MR, Gonçalves IC. Diagnóstico laboratorial da tuberculose: Revisão de literatura. *Rev Med Minas Gerais*, 2018; 28(Supl 5), S280525.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância a Saúde. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como problema de Saúde Pública no Brasil. Brasília: Bol Epidemiol. 2017; 44:1-11.
24. Kadioglu EE, et al. A comparison of two different culture methods for use in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Eur J Med*. 2014; 46(2):74.
25. Koneman E, et al. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Biochemical test of identification of medical bacteria, 1997. Philadelphia, USA: Lippincott, 11-Yean, FM; 2000.
26. Cho WH, et al. Comparação de AdvanSure TB/NTM PCR e COBAS TaqMan MTB PCR para detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* na prática clínica de rotina. *Ann Lab Med*. 2015; 35 :356–361.
27. Nurwidya F, et al. Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Chonnam Med J*. 2018 Jan;54(1):1-9.
28. Senoputra MA, et al. Diagnostic value of antibody responses to multiple antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in active and latent tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83:278–285.
29. Steingart KR, et al. Serological tests for the diagnosis of active tuberculosis: relevance for India. *Indian J Med Res*. 2012;135:695–702.
30. World Health Organization. Tuberculosis serodiagnostic tests policy statement 2011. Geneva: World Health Organization; 2013.
31. Ahmad S, Mokaddas E. Current status and future trends in the diagnosis and treatment of drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Public Health*. 2014;7:75–91.
32. Oliveira SMVL et al. Teste tuberculínico: pesquisa operacional no Mato Grosso do Sul. *J Bras Pneumol* 2011;37:646–54.
33. Ruffino-Netto A, et al. Influence of vial size on the results of the tuberculin test. *J Bras Pneumol*. 2005;31(2):144-8.
34. Pahal P, et al. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556037/>
35. Tahseen S, et al. The value of histological examination in the diagnosis of tuberculous lymphadenitis in the era of rapid molecular diagnosis. *Sci Rep*. 2022 May 27;12(1):8949.
36. Gupta M, et al. A Histomorphological Pattern Analysis of Pulmonary Tuberculosis in Lung Autopsy and Surgically Resected Specimens. *Patholog Res Int*. 2016;2016:8132741.
37. Barreto AMW, et al. Diagnóstico. In: PROCÓPIO, M.J., org. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço [online]. 7th ed. Rev. and enl. 2014; 145-229.

38. Lewinsohn DM, et al. Diretrizes de Prática Clínica Oficial da Sociedade Torácica Americana/Sociedade de Doenças Infecciosas da América/Centros de Controle e Prevenção de Doenças: Diagnóstico de Tuberculose em Adultos e Crianças. *Clin Infect Dis*. 2017; 64 (2):e1-e33.
39. Malekmohammad M, et al. Rendimento diagnóstico da baciloscopia pós-broncoscopia na tuberculose pulmonar. *Scand J Infect Dis*. 2012; 44 (5):369-73.
40. Sharma SK, Mohan A, Kohli M. Extrapulmonary tuberculosis. *Expert Rev Respir Med*. 2021;15(7):931-948.