

Caso Clínico

Clinical Case

João Costeira¹
Jaime Pina²

A tuberculose multirresistente e a rainha vermelha – A rapidez do diagnóstico é decisiva

Multi-drug resistant tuberculosis and the red queen – Diagnosis speed is crucial

Recebido para publicação/received for publication: 07.07.02
Aceite para publicação/accepted for publication: 07.09.12

Resumo

A tuberculose multirresistente é uma ameaça importante ao controlo da tuberculose.

Neste sentido, é fundamental o diagnóstico precoce da TBMR para adoptar as medidas mais adequadas.

Os métodos de detecção da resistência aos antibacilares baseados na avaliação das determinantes genéticas (métodos genotípicos) têm a vantagem, em relação aos métodos clássicos (fenotípicos), de serem mais céleres, poderem ser aplicados directamente na amostra clínica e de identificarem simultaneamente o *Mycobacterium tuberculosis complex*.

A análise dos dados dos doentes internados no Serviço de Pneumologia 2 do Hospital de Pulido Valente mostrou uma significativa prevalência de TBMR (10,3%). Revelou, também, que em 34,1% dos doentes com TBMR a multirresistência não foi identificada, tendo sido a mortalidade nesses doentes de 31% *versus* 18,4% nos doentes com o perfil de resistências

Abstract

The multi-drug resistant Tuberculosis (MDRTB) is a huge menace to Tuberculosis control.

The early detection of MDRTB is essential to best appropriate measures.

The detection methods for drug resistance based in evaluation of the genetic determinants (genotypic methods), instead of phenotypic methods, allows for faster results, the possibility of direct application in clinical samples and simultaneous identification of *Mycobacterium tuberculosis complex*.

The inpatients data analysis in the “Serviço de Pneumologia 2 do Hospital Pulido Valente”, showed a high prevalence of MDRTB (10.3%). In 34.1% of the MDRTB patients the multi-drug resistance was not been identified, with a mortality ratio in this cases of 31% versus 18.4% in the subset of patients with resistance previously identified. Moreover the mortality ratio was worst in

¹ Assistente Hospitalar Graduado de Pneumologia
João.Costeira@hvp.min-saude.pt

² Chefe de Serviço Hospitalar de Pneumologia e Director do Serviço de Pneumologia 2 do Hospital de Pulido Valente, Lisboa

Hospital de Pulido Valente, EPE
Alameda das Linhas de Torres
117 1769-001 Lisboa

previamente conhecido. Estes valores são piores nos doentes com TBMR+SIDA, que têm uma mortalidade de 50% *versus* 15%, respectivamente.

Para uma rápida identificação das resistências nos doentes internados no Serviço de Pneumologia 2 do HPV, foi avaliado o teste INNO-LIPA Rif.TB para detecção da resistência à RMP como marcador de multirresistência. Os resultados do teste, efectuado em 113 amostras, mostraram elevadas taxas de sensibilidade (91,6%), especificidade (98%), valor preditivo positivo (84,6%) e valor preditivo negativo (99%).

A demora média para obter os resultados foi de 7,6 dias para o teste genotípico *versus* 23,4 dias para o teste fenotípico (BACTEC MGIT 960).

Actualmente, o teste INNO-LIPA Rif. TB é aplicado em todos os doentes internados com tuberculose bacilífera sem perfil de resistências previamente conhecido, com bons resultados.

MDRTB/AIDS patients with 50% versus 15%, respectively.

Targeting for rapid drug resistance detection, in hospitalized patients at “Serviço de Pneumologia 2 do Hospital Pulido Valente”, the test INNO-LIPA Rif.TB, to identify the rifampicin resistance as a marker of multi-drug resistance, was evaluated.

The test was performed in 113 samples and had a high ratio of sensitivity (91.6%), specificity (98%), positive predictive value (84, 6%) and negative predictive value (99%).

Time to obtain the results was 7.6 days for the genotypic test versus 23.4 days to the phenotypic test (BACTEC MGIT 960).

The INNO-LIPA Rif.TB test is, now, performed in every patient with smear-positive Tuberculosis with no previous known resistance profile, with good outcome.

Rev Port Pneumol 2007; XIII (6): 869-877

Rev Port Pneumol 2007; XIII (6): 869-877

Palavras-chave: Tuberculose multirresistente, método genotípico, sensibilidade, especificidade.

Key-words: Multi-drug resistant tuberculosis, genotypic method, sensitivity, specificity.

Introdução

A resistência aos antibacilares é um problema conhecido desde a introdução destes fármacos no tratamento da tuberculose.^{1,2}

O mecanismo de acção dos antibacilares está associado a uma pressão selectiva sobre uma população de *Mycobacterium tuberculosis* que contém bacilos portadores de mutações adquiridas espontaneamente, que lhes conferem protecção à actividade antimicobacteriana dos antibacilares^{3,4}. Esta adversidade terapêutica é minimizada com o uso correcto da politerapia⁵.

Este fenómeno, no entanto, ganhou uma nova dimensão com a emergência a partir dos anos 80 do século passado de vários surtos epidémicos, nosocomiais e na comunidade, de tuberculose multirresistente (TBMR)⁶, principalmente em doentes com infecção pelo VIH com elevada mortalidade e significativa contagiosidade^{7,8}. A tuberculose multirresistente, que se define como tuberculose resistente, pelo menos, aos dois antibacilares bactericidas mais potentes – isoniazida (INH) e rifampicina (RMP) – e nucleares nos regimes terapêuticos anti-tuberculosos. Nestes casos, o tratamento torna-se mais

complicado, mais demorado, associado a maior toxicidade, com níveis mais elevados de insucesso terapêutico e cerca de 100 vezes mais caro^{9,10}.

A tuberculose multirresistente é um indicador da qualidade do controlo da tuberculose na comunidade.

A tuberculose multirresistente em doentes previamente tratados, denominada TBMR adquirida (TBMR 2.^a), reflete índices insuficientes de sucesso terapêutico e níveis elevados de má adesão à terapêutica.

A TBMR primária (TBMR 1.^a), assim designada quando detectada nos novos casos de doença, sem tratamento antibacilar anterior, é um indicador da falência do controlo da doença em longos períodos de tempo, pois revela a transmissão da infecção na comunidade.

Os relatórios da OMS sobre a TBMR no mundo mostram uma distribuição da TBMR assimétrica a nível regional, com prevalências mais

acentuadas na Europa de Leste, Sudeste Asiático e Mediterrâneo Oriental (Quadro I), com locais onde a TBMR primária tem taxas entre 7% e 14% (Lituânia, Estónia, algumas regiões da Federação Russa, algumas regiões da China, Israel, etc.) e TBMR adquirida com taxas de cerca de 50% (Lituânia e Cazaquistão).

Em Portugal tem-se vindo a registar, na última década, uma diminuição acentuada da prevalência da TBMR, principalmente à custa duma descida dos casos de retratamento, acompanhada dum aumento do sucesso terapêutico. A TBMR primária tem tido, também, um declínio, embora mais atenuado (Quadro II).

A distribuição por distrito tem diferenças acentuadas. Em quatro distritos – Lisboa, Setúbal, Porto e Aveiro – concentram mais de 80% dos casos. Lisboa tem a maior parte dos casos (44,1%). O grupo de risco mais afectado é o dos doentes com infecção pelo VIH, que apresenta o

Em Portugal tem-se vindo a registar, na última década, uma diminuição acentuada da prevalência da TBMR

Quadro I – Prevalência da tuberculose resistente no Mundo em 2004

Região	Resistências 1. ^a	TBMR 1. ^a	Resistências 2. ^a	TBMR 2. ^a
África	7,1	1,4	16,7	5,9
Américas	9,7	1,1	24,6	7,0
Mediterrâneo Oriental	9,9	0,4	63,3	48,3
Europa	8,4	0,9	15,9	4,7
Sudeste Asiático	19,8	1,3	39,9	20,4
Pacífico Ocidental	11,4	0,9	32,8	15,5
Total	10,2	1,1	18,4	7,0

Adaptado de OMS, 2006

Quadro II – Evolução da tuberculose multirresistente em Portugal

Fontes	DGS/OMS (1994-1997)	SVIG-TB (2000-2002)	SVIG-TB (2000-2003)	SVIG-TB (2000-2004)	SVIG-TB (2000-2006)
TBMR 1.^a	1,8	2,3	2,1	1,9	1,7
TBMR 2.^a	20,9	10,4	7,8	7,4	7,4

Adaptado SVIG-TB (2000-2006)

O resultado do tratamento da TBMR em Portugal mantém-se desfavorável, com taxas de sucesso terapêutico insuficientes para controlar com eficácia a epidemia

nível de prevalência de TBMR primária mais elevado (3,3%), e o dos doentes toxicodependentes, que tem a taxa de prevalência de TBMR adquirida mais alta (11,8%) (Quadro III).

Quadro III – Tuberculose multirresistente por grupos de risco em Portugal

Grupos de risco	TBMR 1. ^a	TBMR 2. ^a
Toxicodependentes	2,6	11,8
VIH	3,3	11,2
Global	1,9	7,4

Adaptado SVIG-TB (2000-2004)

O resultado do tratamento da TBMR em Portugal mantém-se desfavorável, com taxas de sucesso terapêutico insuficientes (51,4%) para controlar com eficácia a epidemia. Regista-se, igualmente, uma elevada mortalidade, cerca de 4 vezes a taxa de mortalidade global (Quadro IV).

Quadro IV – Resultado do tratamento da TB e TBMR em Portugal em 2002

Resultado tratamento	TBMR (%)	TB(%) (global)
Curados	9,0	9,4
Tratamento completo	42,5	73
Falecidos	25,5	5,7
Insucesso	2,4	0,1
Tratamento interrompido	4,7	4,8
Em tratamento	6,1	2,9
Transferidos	7,6	4,1
Sucesso terapêutico	51,4	82

Adaptado SVIG-TB, corte 2002

A TBMR e mais recentemente a emergência da tuberculose extensivamente resistente (TBXDR)^{11,12,13}, esta última definida como TBMR com resistências adicionais às fluorquinolonas e, pelo menos, a uma dos antibióticos

injectáveis seguintes: capreomicina, canamicina ou amicacina, constituem, actualmente, uma ameaça séria ao controlo da tuberculose^{14,15}.

Neste contexto, é fundamental o diagnóstico precoce desta forma de tuberculose através da detecção rápida das resistências, de maneira a adoptar, prontamente, medidas de controlo de infecção, na comunidade e nas instituições de saúde que acolhem estes doentes, assim como instituir os regimes terapêuticos com os antibióticos mais adequados a cada caso¹⁶.

A detecção de resistências aos antibióticos usando os métodos fenotípicos clássicos (ex.: método das proporções), fiáveis e amplamente testados, tem a desvantagem de necessitar dum longo período de tempo para obter os resultados. Neste sentido, a exigência de mais rapidez no conhecimento dos resultados levou à utilização de métodos radiométricos (ex.: BACTEC TB-460 e BACTEC MGIT-960) para a detecção de resistências, essencialmente aos antibióticos de primeira linha, e mais recentemente a aplicação de métodos genotípicos^{17,18}.

Os métodos genotípicos são baseados na avaliação das determinantes genéticas das resistências e envolvem dois passos básicos: a amplificação do ácido nucleico através da reacção em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar os sectores do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* que se sabe estarem alterados nas estirpes resistentes e, em seguida, confrontar esse material genético com genes-alvo de referência responsáveis pelas resistências em análise, utilizando hibridação com sondas específicas^{19,20}.

Estes métodos têm a vantagem de serem muito mais rápidos do que os métodos fenotípicos, poderem ser aplicados directamente na amostra clínica e proceder simultaneamente à identificação de *Mycobacterium tuberculosis complex*. Têm como limitação o facto de ainda não se

conhecer completamente o mecanismo molecular de todo o tipo de resistências. Contudo, tendo em conta que são conhecidas as localizações genéticas que conferem a maioria da resistência à isoniazida (gene *katG* – 50% a 95% dos casos) e à rifampicina (gene *rpoB* – 95% dos casos), o método genético pode ser uma ferramenta importante no controlo da TBMR.

A experiência de um serviço de internamento

O Serviço de Pneumologia 2 (Pn2) do Hospital de Pulido Valente (HPV) é um serviço dedicado ao tratamento, em regime de internamento, de doentes com tuberculose.

A análise dos dados clínicos dos doentes internados neste serviço de 1.1.2000 a 1.4.2007, revelaram a existência duma elevada taxa de internamentos de doentes com SIDA e TB (35,1%), com TBMR (10,3%) dos quais 34,5% eram TBMR primária. Dos casos com TBMR 77 (53,1%), tinham como comorbilidade a SIDA (Quadros V e VI).

A avaliação dos casos com TBMR bacilíferos mostra que em 34,1 % dos casos não foi possível a identificação das resistências antes da alta dos doentes. A demora média destes doentes no serviço foi de 20,8 dias.

Quadro V – Taxa de TB+SIDA e TBMR no Serviço de Pn2 do HPV

TB total	TB+SIDA	TBMR
1066	496 (35,1%)	145 (10,3%)

Quadro VI – Taxa de TBMR por classe epidemiológica no Serviço de Pn2 do HPV

	TBMR total	TBMR+SIDA
Primária	50 (34,5%)	23 (29,9%)
Adquirida	95 (65,5%)	54 (70,1%)
Total	145	77

Os doentes acima referidos durante o período que estiveram internados no serviço, por ausência de identificação das resistências, não foram submetidos a terapêutica antibacilar nem a isolamento respiratório apropriados. O resultado do tratamento revela uma elevada mortalidade nestes doentes (31%), em comparação com os doentes com TBMR previamente conhecida e tratados com regime antibacilar alternativo (18,4%). A taxa de mortalidade é ainda mais gravosa se atendermos aos casos com SIDA associada – 50% nos doentes com TBMR não identificada *versus* 15% nos doentes com TBMR conhecida (Quadro VII).

Quadro VII – Taxa de mortalidade e tempo de internamento da TBMR no Serviço de Pn2 do HPV

	N.º	Mortalidade (%)	Demora média do internamento (dias)
TBMR D+ (total)	132	22,7	58,4
SIDA+TBMR D+ (total)	68	29,4	49,5
TBMR D+*	87	18,4	96
SIDA+TBMR D+*	40	15	77,2
TBMR D+**	45	31	20,8
SIDA+TBMR D+**	28	50	21,8

* Resistências conhecidas durante o internamento

** Resistências desconhecidas durante o internamento

A avaliação laboratorial do perfil de resistências das amostras respiratórias testadas desde 12.3.1999 a 1.4.2007, indica que apenas em 0,5% dos casos a resistência à rifampicina não estava associada à multirresistência (Quadro VIII).

Os doentes internados neste serviço apresentavam uma alta prevalência de multirresistência, incluindo valores muito elevados de TBMR primária e um índice muito baixo de monorresistência à RMP. Neste contexto, e em consonância com vários outros estudos, a resistência à rifampicina pode ser considerada um bom marcador de multirresistência^{21,22}.

Com o objectivo de implementação duma metodologia capaz de possibilitar uma rápida identificação da tuberculose pulmonar multirresistente (TPMR) em doentes com TP bacilífera internados no HPV, foi avaliada, a eficácia do teste genotípico de amplificação de ácidos nucleicos pela técnica INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics, Ghent, Belgium) para identificação directa, na amostra respiratória do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e detecção das determinantes genéticas para a resistência à RMP.

O estudo incidiu sobre 113 amostras respiratórias com baciloscopia positiva obtidas de doentes internados no período de 1.1.2005 a 6.1.2006. Os indicadores de eficácia do teste foram analisados usando como métodos de referência o sistema BACTEC MGIT 960 para isolamento em cultura e realização de antibiograma para os antibacilares de 1.ª linha e o sistema Accuprobe para identificação de *Mycobacterium tuberculosis complex*.

Os testes com o sistema INNO-LiPA Rif.TB foram realizados no laboratório de micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa e os testes de referência com sistema BACTEC MGIT 960, assim como as baciloscopias, foram efectuados no laboratório de micobacteriologia do Serviço de Patologia Clínica do HPV.

Os resultados do teste mostraram uma alta especificidade e sensibilidade, bem como elevados valores preditivos, tanto para a identificação directa dos bacilos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, como para a detecção directa de mutações no gene rpoB (Quadro IX). As características dos doentes internados, com alta prevalência de TPMR bacilífera e

Quadro VIII – Perfil de resistência aos antibacilares no Serviço de Pn2 do HPV

Amostras com TSA*	Casos novos	Retratamento	Total
Total de amostras	965	365	1330
Qualquer resistência à R	53 (5,5%)	99 (27,1%)	153 (11,4%)
Resistência a R não MR	3 (0,3%)	4 (1,1%)	7 (0,5%)
Qualquer resistência à H	82 (8,5%)	112 (30,7%)	194 (14,6%)
Resistência a H não MR	32 (3,3%)	17 (4,7%)	49 (3,7%)
Monorresistência à R	3 (0,3%)	0	3 (0,2%)
Monorresistência à H	17 (1,8%)	10 (2,7%)	27 (2%)
Monorresistência à S	60 (6,2%)	9 (2,5%)	69 (5,2%)
Multirresistência total	50 (5,2%)	95 (26%)	145 (10,9%)

*Teste de sensibilidade aos antibacilares

Quadro IX – Potência do teste INNO-LiPA Rif.TB

INNO-LiPA Rif.TB	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
Identificação directa de <i>M. tuberculosis complex</i>	99% (112/113)	100% (1/1)	100% (112/112)	50% (1/2)
Deteção directa da mutação de rpoB	91,6% (11/12)	98% (99/101)	84,6% (11/13)	99% (99/100)

de SIDA, associado à boa fiabilidade do teste, levou à implementação da avaliação sobre a multirresistência em todos os doentes internados no Serviço de Pneumologia 2 com TP bacilífera, sem perfil de resistência conhecido, através do método genotípico do sistema de INNO-LiPA Rif.TB.

No período de 1.10.2006 a 1.4.2007 foram testadas 79 amostras de expectoração. A *performance* do teste mantém elevados índices de eficácia.

Os resultados obtidos desde o dia em que a amostra foi enviada para o laboratório até ao dia em que o resultado foi conhecido pelo médico assistente tiveram uma demora média de 7,6 dias para o teste genotípico e de 23,4 dias para o teste fenotípico.

A rapidez alcançada com o teste genotípico leva a uma considerável antecipação do possível diagnóstico de TPMR.

Durante este período de avaliação sistemática da multirresistência com o método genotípico foi possível diagnosticar três casos de TPMR, possibilitando, mais precocemente, a contenção dos doentes em isolamento respiratório e o início do tratamento antibacilar mais adequado.

Considerações finais

O diagnóstico precoce é um factor essencial na luta contra a TBMR. Quanto mais depressa

se obtiver o diagnóstico micobacteriológico mais rapidamente se podem tomar medidas de controlo de infecção e tratamento ajustadas.

Os seres vivos evoluem continuamente para manter o seu lugar no seu meio biológico e físico. Como todas as espécies evoluem com esse objectivo, desencadeia-se um confronto entre elas, como, por exemplo, entre o parasita e o seu hospedeiro²³.

As alterações evolucionárias são necessárias para as espécies se manterem no mesmo lugar. A cessação das mudanças pode resultar na extinção²⁴.

O biólogo Leigh Van Valen baptizou esta sua teoria de “rainha vermelha”²⁵ em referência ao episódio das aventuras de *Alice do outro lado do espelho*, de Lewis Carrol. Nesse episódio, Alice e um personagem fantástico, a Rainha Vermelha, lançam-se numa corrida imparável. Alice sentia que não podia correr mais, no entanto tudo o que estava à sua volta não se alterava. E disse, então, à Rainha: “Uma pessoa geralmente costuma chegar a qualquer lugar se correr muito depressa e durante muito tempo”, ao que a Rainha respondeu: “Aqui é preciso correr o mais que se pode, para ficar sempre no mesmo lugar.”²⁶

A rapidez da adaptação ao meio é a chave do sucesso dos seres vivos.

O diagnóstico precoce é um factor essencial na luta contra a TBMR

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração dos Dr. Miguel Viveiros e seus colaboradores, do laboratório de micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, e Dr.^{as} Margarida Abecassis e Lourdes Carrilho, do laboratório de micobacteriologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Pulido Valente.

Bibliografia

1. Youmans G P, Williston E H, Feldman W H, Hinshaw H C. Increase in resistance of tubercle bacilli to streptomycin, preliminary report. *Mayo Clin* 1946; 21: 126-7.
2. Sungkanuparh S, Eampokalap B, Chottanapund S, Thongyen S, Manosuthi W. Impact of drug-resistant tuberculosis on the survival of HIV-infected patients. *Int J Tuberc Dis* 2007; 11 (3): 325-30.
3. Mitchison DA. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 10-5.
4. Mitchison DA, Nunn A J. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133 (3): 423-30.
5. WHO. Treatment of Tuberculosis. Guidelines for national programmes. 3rd edn. WHO/CDS/2003.313. Geneva. World Health Organization. 2003.
6. Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn J O, Cauthen G M, Dooley S W. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993; 328:521-6.
7. Nosocomial transmission of multi-drug resistant tuberculosis among HIV-infected persons – Florida and New York, 1988-1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1991; 40: 585-91.
8. Quy H T, Cobelens F G, Lan N T, Buu T N, Lambregts C S, Borgdorff M W. Treatment outcomes by drug resistance and HIV status among tuberculosis patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10 (1): 45-51.
9. Chiang CY, Enarson DA, Yu MC, Bai KJ, Huang RM, Hsu CJ, SuoJ, Lin TP. Outcome of pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: a 6 yr follow-up study. *Eur Respir J* 2006; 28: 980-5.
10. Sungkanuparh S, Eampokalap B, Chottanapund S, Thongyen S, Manosuthi W. Impact of drug-resistant tuberculosis on the survival of HIV-infected patients. *Int J Tuberc Dis* 2007; 11 (3): 325-30.
11. World Health Organization, Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. *Wkly Epidemiol Rec* 2006; 81:430-2.
12. Migliori G B, Ortmann J, Girardi E, Besozzi G, Lange C, Cirillo D M, Ferrarese M, Iaco G, Gori A, Raviglione M C, and SMIRA/TBNET Study Group, Extensively Drug-resistant Tuberculosis, Italy and Germany, *CDC Emerging Infectious Diseases* 2007; 13:780-2.
13. Sharma SK, Mohan A., Multidrug-Resistant Tuberculosis A Menace That Threatens To Destabilize Tuberculosis Control, *Chest* 2006; 130:261-72.
14. Migliori G B, Lodenkemper R, Blasi F, Raviglione M C. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic? *Eur Respir J* 2007; 29:423-7.
15. Gandhi N R, Moll A, Sturn A W, Pawinski R, Govender T, Lallo U, Zeller K, Andrews J, Friendland G. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006; 368:1575-80.
16. Nahid P, Pai M., Hopewell P, Advances in the Diagnosis and Treatment of Tuberculosis, *Proc Am Thorax Soc* 2006; 3:103-10.
17. Tortoli E, Palomino JC, Chapter 14 New Diagnostic Methods, *Tuberculosis 2007 TuberculosisTextbook.com*, First Edition, 441-86.
18. Anandi Martin and Françoise Portals; Chapter 19: Drug Resistance and Drug Resistance Detection, *Tuberculosis 2007 TuberculosisTextbook.com*. First Edition, 635-60.
19. Traore, H., Deun A, Shamputa I C, Rigouts L, Portals F. Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA and Rifampin Resistance in Clinical Specimens from Tuberculosis Patients by Line Probe Assay, *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44:4384-8.
20. Viveiros M., Leandro C., Rodrigues L., Almeida J, Bettencourt R, Couto I, *et al.* Direct Application of the INNO-LIPA Rif-TB Line-Probe Assay for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains and Detection Resistance in 360 Smear-Positive Respiratory Specimens from an Area of High Incidence of Multi-drug-Resistant Tuberculosis, *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43:4880-4.

21. Morgan M., Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis, BMC infectious Diseases 2005; 5:62.
22. Viveiros M, Leandro C, Rodrigues L, Almeida J, Bettencourt R, Couto I, *et al.* Diagnóstico da Tuberculose O Programa “Faster-Track” de Combate à Tuberculose Multirresistente na Grande Lisboa, Tuberculose-Impacto da Infecção pelo VIH 12.^a Reunião de Pneumologistas do Hospital Pulido Valente 2005; 83-99.
23. Kaufmann SHE, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. J Exp Med 2005; 6:1963-7.
24. Schluger N W. The Pathogenesis of Tuberculosis, The First One Hundred (and Twenty-Three) Years, Am J Respir Cell Mol Biol 2005; 32:251-6.
25. Van Valen L. A new evolutionary law. Evolutionary Theory 1973; 1:1-30.
26. Carrol L. 1872. Through the looking glass and what Alice found there. MacMillan, London.