



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde

Adriana Antônia da Cruz Furini

Avaliação de diagnósticos do *Mycobacterium*
spp. em populações diferencialmente
susceptíveis

São José do Rio Preto
2010

Adriana Antônia da Cruz Furini

Avaliação de diagnósticos do *Mycobacterium*
spp. em populações diferencialmente
susceptíveis

Dissertação apresentada a
Faculdade de Medicina de São
José do Rio Preto para obtenção
do Título de Mestre no Programa
de Pós Graduação em Ciências
da Saúde, Eixo Temático:
Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Regina B. Rossit

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

São José do Rio Preto

2010

Furini, Adriana Antônia da Cruz
Avaliação de diagnósticos do *Mycobacterium* spp. em
populações diferencialmente susceptíveis / Adriana Antônia da
Cruz Furini

São José do Rio Preto, 2010.

99p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José
do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Regina Baptista Rossit

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

1. Tuberculose; 2. HIV; 3. *Nested-PCR*; 4. *Mycobacterium* spp.

ADRIANA ANTÔNIA DA CRUZ FURINI

**Avaliação de diagnósticos do
Mycobacterium spp. em populações
diferencialmente susceptíveis**

BANCA EXAMINADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE

Presidente/Orientador:

Profa. Dra. Andrea Regina Baptista Rossit

2º Examinador: Prof.Dr. Irineu Luiz Maia

3º Examinador: Prof.Dra. Lilian Castiglioni

Suplentes: Prof.a. Dra. Margarete Teresa G. de Almeida

Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli

São José do Rio Preto, 23 de Setembro de 2010

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	v
Lista de Figura.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
Introdução	1
Objetivos.....	5
Artigos Científicos.....	8
Artigo 1.....	9
Artigo 2.....	26
Artigo 3.....	51
Conclusões.....	68
Referências.....	69
Apêndices.....	80
Anexos.....	84

DEDICATÓRIAS

- A pequena Marina, por toda felicidade, de me fazer descobrir tesouros nunca antes sonhados. Minha filha, meu tesouro, minha vida.
- A minha filha Fernanda, que virá para alegrar mais ainda nossa família.
- Ao meu eterno namorado, meu marido, meu amigo, meu grande amor:
Marcos Furini
- Aos meus pais: “Eu teria tanto para falar, que com palavras nem sei dizer, como foi, é, e sempre será infinito meu amor por vocês”.
- A minha irmã Edna, querida companheira, incansável na busca da felicidade de todos.
- Aos meus irmãos, sobrinhos, sobrinhas, à minha família.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela coragem, força e oportunidades.
- A minha orientadora, Prof.^a. Dra. Andrea Regina Baptista Rossit docente do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da FAMERP e responsável pelo CIM – Centro de Investigação de Microrganismos, por todo seu carinho, e por eu ter compartilhado nesses dois anos de toda sua sabedoria e conhecimento. Dizer que é admirável ver você escrever, falar ou lecionar. Enfim, você tem hoje o que o seu esforço pela educação e ensino lhe proporcionou. Obrigada, por tudo que me ensinou, minha professora, minha mestra, minha amiga.
- Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, docente do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da FAMERP, líder do grupo de pesquisa CIM/CNPq, por suas contribuições didáticas, científicas e experimentais. Afinal por sua amizade, dedicação e prontidão. Por acreditar no ensino e na pesquisa de maneira singular.
- Ao aluno Jean Francisco Rodrigues do curso de graduação em Farmácia do Centro Universitário de Rio Preto, pela disponibilidade, empenho, dedicação, prontidão, enfim por tudo o que fez por mim. Meu muito obrigada.
- A Msc. Heloisa da Silveira Paro Pedro, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto- IAL pela amizade, trabalho conjunto, enfim por nossas pesquisas.

- As pesquisadoras Dra. Haiana Scharifker Schindler e Msc. Lilian Maria Lappa Montenegro da Fundação Oswaldo Cruz – Recife por ensinar a técnica molecular, pela disponibilidade, prontidão e dedicação. Obrigada Lilian, por compartilhar o que sabe.
- Ao aluno Marcell Santana do curso de graduação em biomedicina da Universidade Paulista de São José do Rio Preto, pela disponibilidade, empenho, dedicação, prontidão.
- Obrigada aos professores, Prof.a. Dra Andrea, Prof. Dr. Ricardo e Prof. Dr. Carlos, e as funcionárias Valeria Fraga e Luciana Moran, pelo comprometimento, dedicação, ajuda nas análises laboratoriais, estatísticas e fluxo das amostras. Sem vocês esse trabalho não seria possível.
- Aos meus amigos e amigas Tabata, Cleide, Paula, Ana Gabriela, Edna, Arlindo, Andrea, Daniela, Gisele, Cintia, Raquel, Ivone, Deidila, alguns; amigos de uma vida toda, outros recentes, mas todos sempre lembrados.
- À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pela excelência em qualidade nos cursos *Strictu sensu*.
- À Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto –Funfarme, especialmente ao serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP), representada pelo Prof. Dr. Irineu Luiz Maia que disponibilizou o serviço.
- Ao Centro Universitário de Rio Preto, em nome de Tabata Atique e Halim Atique Netto pelo incentivo para a realização desse trabalho.
- À Dra. Célia Franco e à enfermeira Edna Castro, do DIP- Hospital de Base de São José do Rio Preto, pelo comprometimento com o trabalho. Muito

obrigada pela dedicação, pela triagem rigorosa dos pacientes e coleta das amostras.

- Ao Dr. Roberto Acayaba de Toledo, ao Dr. João Baptista Salomão Júnior, a Dra. Ida Maria Maximina Fernandes pela triagem rigorosa dos pacientes e coleta das amostras.
- A Dra. Luciana de Souza Jorge, por toda sua dedicação e ajuda com os prontuários do Hospital de Base.
- Aos pacientes, muito obrigada.
- As instituições de fomento e pesquisa, em especial aos auxílios CNPq, pelos recursos financeiros que foram imprescindíveis para a execução desse trabalho.
- Enfim, obrigada a todos, que diretamente ou não, contribuíram para a realização desse trabalho.

EPÍGRAFE

“ Ser mãe é realizar a ponte que liga o ser humano a Deus, é desabrochar o anjo amoroso que aguarda adormecido no coração. É viver o suave mistério do amor que renova as forças para as tarefas que nos aguardam, enriquecendo nossas almas com tesouros sonhados.”

Autor desconhecido

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose demonstrando os amplicons de 365bp, produto da amplificação por *NPCR* do elemento de inserção *IS6110*. M: marcador (Low Mass Ladder - Invitrogen®) Faixa 1, controle negativo da extração; Faixas 2, 3, 5, 6, 7, 8 pacientes do estudo; Faixa 4, controle negativo da PCR; Faixas 9 e 10, quantidades seriadas de DNA genômico, com respectivamente 100pg e 1pg de cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ; M: marcador (Low Mass Ladder - Invitrogen®).....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos 77 pacientes de acordo com os critérios de inclusão do estudo, com subdivisão em soropositivos e soronegativos para o HIV-1.....66

Tabela 2. Resultados obtidos a partir do diagnóstico fenotípico (BAAR e cultura) e molecular (*NPCR - IS6110*) para detecção do *Mycobacterium* spp. em 109 espécimes clínicos de indivíduos soropositivos e soronegativos para o HIV-1.....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CIM	Centro de Investigação de Microrganismos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ETH	Etambutol
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HAART	Terapia Antirretroviral de Alta Atividade (sigla em inglês de <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>).
HB	Hospital de Base
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
IAL	Instituto Adolfo Lutz
INH	Isoniazida
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
LTCD4⁺	Linfócitos do tipo TCD4 ⁺
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MDR-TB	Tuberculose Multi-droga resistente
MNTs	Micobactérias não tuberculosas
MT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NPCR	Nested PCR
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PCR- IN TUBE	Reação da Polimerase em Cadeia em único tubo
PCR/RFLP	Reação da Polimerase em cadeia/Polimorfismo do Tamanho do fragmento de restrição
RMP	Rifampicina
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SM	Streptomomicina

TE	Tris-Edta
TB	Tuberculose
TST	Teste de Sensibilidade a Tuberculina

RESUMO

Introdução. O diagnóstico das formas paucibacilares da tuberculose (TB), que acomete principalmente crianças, imunocomprometidos, transplantados e formas extrapulmonares é limitado pelas técnicas fenotípicas de baciloscopia e cultura. Ademais, o diagnóstico das micobacterioses, também apresenta-se comprometido pelos métodos fenotípicos. A reação da polymerase em cadeia (PCR) e suas variações, tais como a Nested-PCR (NPCR), tem sido descritas como técnicas promissoras para o rápido diagnóstico da tuberculose e micobacterioses. **Objetivos.** Avaliação de um protocolo de NPCR para detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em sítios anatômicos pulmonares e extrapulmonares de indivíduos com suspeita clínica de TB. **Casuística e Método.** Foram incluídas, prospectivamente, 24 amostras de sítios pulmonares e 85 extrapulmonares, coletadas a partir de 49 indivíduos soropositivos para o HIV e 28 soronegativos e submetidas ao método gold standard e a NPCR tendo como alvo o transposon *IS6110*. **Resultados.** A tuberculose foi diagnosticada em 11 pacientes (14,3%), com 54,5% de formas extrapulmonares e 45,5% pulmonares. A NPCR foi positiva em todos, enquanto a cultura em apenas cinco deles. A positividade da baciloscopia entre os espécimes clínicos foi de 9,2%. A cultura permitiu o isolamento de sete cepas de *M. tuberculosis* e duas do *Complexo M. avium* (8,25%). A positividade molecular foi descrita em 23,85% das amostras. O desempenho da NPCR frente a cultura, para amostras pulmonares (n=22) e extrapulmonares (n=83) foi similar (100% de sensibilidade e aproximadamente 83% de especificidade). A positividade pela NPCR foi significativamente maior que o isolamento por cultura entre as amostras extrapulmonares (p=0.0042).

Conclusões. Os resultados obtidos sugerem a realização de estudos mais amplos que corroborem o potencial da NPCR-IS6110 para a detecção do genoma micobacteriano na TB extrapulmonar, em especial entre imunocomprometidos. Ademais, a detecção da micobactéria permanece como confirmação diagnóstica e a oportunidade de investigação do perfil de sensibilidade, favorecendo o tratamento efetivo para qualquer faixa etária e *status* imunológico.

Palavras Chave: Diagnóstico molecular, *Mycobacterium tuberculosis*, Nested-PCR, Paucibacilares, Transposon IS6110

ABSTRACT

Introduction. The diagnosis of paucibacillary forms of tuberculosis (TB), which mostly affects children, immunocompromised patients, transplanted and extra-pulmonary forms is limited by phenotypic techniques of smear and culture. Moreover, the diagnosis of mycobacteriosis, also has committed itself by the phenotypic methods. The polymerase chain reaction (PCR) and its variations, such as Nested-PCR (NPCR), has been described as promising techniques for rapid diagnosis of tuberculosis and mycobacteriosis. **Objective.** Evaluation of a NPCR protocol for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary anatomic sites of patients with clinical suspicion of TB. **Subjects and Methods.** Were included, prospectively, 24 pulmonary samples of 85 extrapulmonary, collected from 49 individuals HIV-seropositive and 28 HIV-seronegative and submitted to the gold standard method and NPCR targeting the transposon IS6110. **Results.** Tuberculosis was diagnosed in 11 patients (14,3%), with 54,5% of extrapulmonary forms and 45,5% pulmonary. The NPCR was positive in all, while the culture was positive in only seven of them. Smear positivity among the clinical specimens was 9,2%. The culture allowed the isolation of seven strains of *M. tuberculosis* and two *M. avium complex* (8,25%). The molecular positivity was described in 23,85% of samples. NPCR's performance against the culture, for pulmonary (n=22) and extrapulmonary samples (n = 83) was similar (100% sensitivity and specificity of approximately 83%). Positivity by NPCR was significantly greater than the isolation by culture among the extrapulmonary samples ($p = 0,0042$). **Conclusions.** The results suggest to perform further studies to corroborate the potential of NPCR-IS6110 for detection of mycobacterial

genome in extrapulmonary TB, especially among immunocompromised. Furthermore, the detection of mycobacteria remains as diagnostic confirmation and the opportunity of investigation of the sensitivity profile, promoting effective treatment for any age and immune status.

Key Words: Molecular diagnosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Nested PCR, Paucibacillary, Transposon IS6110

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MT) na forma latente.⁽¹⁻⁵⁾ Em 2006, foram notificados 9,2 milhões de casos com 1,7 milhões de mortes para tuberculose (TB) e 0,7 milhões de co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1).^(2,4,6) Dos nove milhões de casos estimados, aproximadamente 75% ocorre em vinte e dois países em desenvolvimento que concentram 80% dos casos; no qual o Brasil ocupa a 14^o posição.^(3,4,7,8) Em 2008 no Brasil, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 81.660 casos de TB,⁽⁹⁾ dos quais 19.024 foram no Estado de São Paulo.⁽⁸⁾

A nível mundial, aproximadamente 33 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV-1.⁽¹⁰⁾ Nas Américas, a infecção pelo HIV-1 é um dos fatores que fazem desse continente a segunda maior região do mundo em casos de TB, com representativo número de mortes e custos para o sistema público de saúde.⁽⁷⁾ No Estado de São Paulo, desde o início da década de 80 foram registrados um total de 179.403 casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).⁽¹¹⁾ As micobactérias representam 50% de risco aos infectados pelo HIV-1 e são responsáveis anualmente, a nível mundial, por um terço das mortes em doentes com AIDS.^(3,12-14)

As espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis-BCG*, *M. africanum*, *M. microtti*), as micobacterias não tuberculosas (MNTs), e *M. leprae* compõem o gênero *Mycobacterium*.^(15,16) O MT foi descrito em 1888 por Robert Koch e é o agente etiológico da grande maioria dos casos de TB.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ Esse é um bacilo intracelular facultativo, aeróbio estrito, imóvel, e as propriedades peculiares de sua parede celular rica em ceras, conferem tempo de geração longo e álcool ácido resistência.^(19,20) Entretanto, nas três últimas décadas as infecções por MNTs, denominadas micobacterioses, agentes de infecções pulmonares e extrapulmonares, apresentaram crescimento decorrente da epidemia AIDS, com reconhecimento

clínico e laboratorial.^(6,18,21,22) Ademais, a partir de 1990, os estudos genotípicos também contribuíram para o reconhecimento das MNTs ou para sua reclassificação, que contribuem para a prevenção e terapêutica adequada.^(15,20)

A TB foi, desde 1993, estabelecida pela OMS como condição definidora da AIDS nos infectados pelo HIV-1 e níveis de linfócitos TCD4⁺ (LTCD4⁺) abaixo de 200 células/mm³ são considerados críticos para o desenvolvimento da doença micobacteriana.^(23,24) No Brasil, a introdução da Terapia Antirretroviral de Alta Potência (*Highly Active AntiRetroviral Treatment* - HAART), desde 1996, acarretou em modificações das características clínicas do paciente co-infectado TB/HIV-1, com declínio dos casos de micobacterioses e TB.^(3,13,25) No entanto, as taxas de óbito entre portadores do HIV-1 sob tratamento de TB alcançam índices superiores a 25%, justificando o início da HAART (Terapia Antirretroviral de Alta Atividade) no portador do HIV-1, assim como o diagnóstico e tratamento precoce da TB; seja ele curativo, ou profilático.⁽²⁶⁾

Rotineiramente, o diagnóstico laboratorial da TB e das micobacterioses é realizado por técnicas fenotípicas e bioquímicas.^(18,25,27,28-30) A baciloscopia de escarro, método direto, não-invasivo, rápido e econômico, requer de 5000 a 10000 bacilos por mililitro de amostra, com sensibilidade limitada para a detecção da doença paucibacilar.^(2,6,27,31) Apesar disto, no Sistema Público de Saúde no Brasil, o diagnóstico é geralmente fundamentado nesse método. A cultura de *Mycobacterium spp* é recomendada somente se há suspeita de TB pulmonar, mas a baciloscopia é negativa, exceto nos soropositivos para o HIV-1 e para aqueles com suspeita de TB extrapulmonar.⁽³²⁾

A cultura, considerada “*gold standard*” para o diagnóstico da TB e de suas formas extrapulmonares, apresenta maior sensibilidade que a baciloscopia, com detecção de 10 micobactérias por mL de escarro. Contudo, tal vantagem é comprometida para amostras paucibacilares e ainda requer de 2 a 8 semanas para a visualização de colônias, prolongando o diagnóstico definitivo da doença.^(2,17,18,22,27-29;31,33) Outra situação de desvantagem para soropositivos para o HIV-1/AIDS são as hemoculturas, que apresentam

somente 40% de positividade quando ocorre co-infecção com TB pulmonar e os níveis de LTCD4⁺ abaixo de 200 cél/mm³.⁽³⁴⁾

Embora o quadro clínico e dados radiológicos sejam essenciais para o diagnóstico da TB e micobacterioses, a detecção da micobactéria permanece como confirmação diagnóstica.^(27,35,36) Desta forma, devido às limitações das técnicas fenotípicas, o diagnóstico pode ser baseado exclusivamente em critérios clínicos, que se utilizam de dados epidemiológicos, sintomatologia, e exames suplementares como o histopatológico e radiológico; prática atual em países em desenvolvimento.^(14,6,27,30,37) No entanto, essa rotina investigativa deixa a desejar em pacientes soropositivos para o HIV-1/AIDS, transplantados, portadores de doenças reumáticas, crianças, casos assintomáticos e extrapulmonares; formas paucibacilares, os quais têm ganho, ultimamente, importância epidemiológica.^(6,22,38,39) Ademais, o risco de TB parece estar aumentado em pacientes com doenças reumáticas crônicas, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), e em pacientes em terapia prolongada com corticosteróides ou imunossupressores. Ainda, são relatados casos de reativação de TB em pacientes que receberam mais de 10mg por dia de prednisona e em animais já foi demonstrado que a azatioprina pode causar TB disseminada.^(40,41)

Nesse cenário de falhas nas técnicas fenotípicas para detecção de micobactérias, principalmente em amostras paucibacilares, novas estratégias, como as técnicas moleculares que buscam avaliações mais sensíveis e rápidas são extensivamente estudadas.^(33,36,42,43) De fato, tais métodos permitem a identificação de micobactérias a partir de qualquer espécime clínico e com a capacidade de detectar uma única molécula de material genético, independente do *status* do HIV-1 ou carga microbiana na amostra.^(6,14,37,38,44)

Os ensaios moleculares baseados na reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para micobacterias são realizados com diferentes alvos gênicos, oligonucleotídeos iniciadores, amostras clínicas e protocolos.^(39,45,46) Dentre os alvos destacam-se o *IS6110*,^(47,48) o gene *hsp65* que codifica o antígeno 65KDa,^(22,36) o gene 16S rRNA de *M.avium*,⁽⁴⁶⁾ a região gênica e de 32-KDa,^(44,49,50) o *mtp40* de *M. tuberculosis*,⁽⁴⁴⁾ e o gene *rpoB*.⁽³³⁾ Em relação aos

protocolos descritos os mais estudados, as reações mais utilizadas são o Nested-PCR,^(37,39,51) PCR-*in tube*,⁽⁵²⁾ Multiplex-PCR,^(6,22,36) Amplicor MTB test® (Roche),⁽¹⁷⁾ PCR em tempo real,⁽⁵³⁾ e PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).⁽⁵⁴⁾ No entanto, variabilidade dos parâmetros de sensibilidade e especificidade observada nos testes moleculares para detecção de micobactéria estimula ao desenvolvimento de um protocolo oficial a ser implantado no Sistema Único de Saúde do Brasil.

A cidade de São José do Rio Preto ocupa posição de destaque no panorama nacional. Localizada na região Noroeste do Estado de São Paulo, considerada como prioritária no Programa de Controle da TB pela alta taxa de pacientes com TB e exame sorológico positivo para o HIV-1, com índice de 35 a 51% no período de 1998 a 2005.⁽⁵⁵⁾ A busca de casos de TB na população em geral e principalmente nos soropositivos para o HIV-1 pode prover informações úteis para a elaboração de medidas que possam acarretar na diminuição da prevalência e mortalidade pela doença. Ademais, os dados moleculares obtidos neste estudo serão associados ao protocolo de padronização de técnica molecular da Fundação Oswaldo Cruz /Pernambuco (FIOCRUZ) em parceria com o Ministério da Saúde para o desenvolvimento de um *kit* de detecção de micobactérias no Brasil.

1.1. OBJETIVOS

1.1.a. Objetivo Geral

Considerando o acima exposto, a presente dissertação teve como objetivo geral realizar a tipagem fenotípica e molecular pela técnica de *NPCR*, para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sítios pulmonares e extrapulmonares em um grupo de pacientes supostamente paucibacilares na São José do Rio Preto, região Noroeste paulista.

1.1.b. Objetivos Específicos

Os pacientes envolvidos no estudo eram suspeitos de doença micobacteriana, envolvendo indivíduos soropositivos para o HIV-1/AIDS e

soronegativos (pacientes em uso de terapia imunossupressora, pacientes com insuficiência renal ou transplantados renais), da região Noroeste paulista.

- a) Estimar a frequência de micobactérias e definição de sua espécie.
- b) Descrever os fatores sócio-demográficos e clínico-epidemiológicos dos pacientes envolvidos.
- c) Comparar à sensibilidade, especificidade, e concordância das técnicas moleculares as fenotípicas de baciloscopia e cultura.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Esse trabalho é composto de dois artigos de revisão submetidos a publicação. Os resultados do experimento encontram-se descritos em um terceiro artigo a ser submetido para publicação, bem como sob a forma de resumo publicado em anais de evento científico: um nacional.

Artigos

1. **Furini, Adriana Antônia da Cruz¹**; Pedro, Heloisa da Silveira Paro; Montenegro, Lilian Maria Lapa; Machado, Ricardo Luiz Dantas; Franco, Célia; Schindler, Haiana Charifker; Rossit, Andrea Regina Baptista. **Childhood *Mycobacterium* spp. Infection – A diagnostic challenge.** Arquivos de Ciências da Saúde – submetido.
2. **Furini, Adriana Antônia da Cruz**; Pedro, Heloisa da Silveira Paro; Arlindo, Schiesari Júnior; Machado, Ricardo Luiz Dantas; Andrea Regina Baptista. ***Mycobacterium* spp. e os soropositivos para o HIV/AIDS** Cadernos Saúde Coletiva – submetido.
3. **Furini, Adriana Antônia da Cruz** ; Pedro, Heloisa da Silveira Paro ; Rodrigues, Jean Francisco Rodrigues^{1,2}, Oliveira, Marcell Sant'anna Camacho¹, Montenegro, Lilian Maria Lapa ⁴; Machado, Ricardo Luiz Dantas¹; Franco, Célia⁵; Schindler, Haiana Charifker ⁴; Rossit, Andrea Regina Baptista. **Avaliação da técnica de Nested-PCR para detecção**

do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras pulmonares e extrapulmonares de pacientes suspeitos de tuberculose. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases – a ser submetido.

Resumo apresentado em congresso

1. FURINI, A.A.C, PEDRO, H. S. P, CONCEIÇÃO, L. M, OLIVEIRA, M.S.C, RODRIGUES, J. F, MACHADO, R. L. D, MONTENEGRO, L. M L, SCHINDLER, H. C, FRANCO, C., ROSSIT, A. R.B. **Investigação molecular do *Mycobacterium tuberculosis* em um município prioritário para tuberculose do Noroeste paulista.** In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, XIII Simpósio Brasileiro de Micobactérias, III Simpósio de Coleção de Culturas e II Simpósio de Escherichia coli “ Luiz Rachid Trabulsi”, 2009, Porto de Galinhas. Edição Especial da Revista Microbiologia in foco, julho/agosto/setembro, 2009.

ARTIGO I

A infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas na infância – um desafio diagnóstico

Furini, Adriana Antônia da Cruz ^{1,2}; Pedro, Heloisa da Silveira Paro ³; Montenegro, Lilian Maria Lapa ⁴; Machado, Ricardo Luiz Dantas⁵; Franco, Célia ⁶; Schindler, Haiana Charifker ⁴; Rossit, Andrea Regina Baptista ⁷.

1. Mestranda em Ciências da Saúde; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; FAMERP; Av Brigadeiro Faria Lima, 5416, São José do Rio Preto.
2. Professora Especialista do Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP
3. Pesquisadora do IAL; Setor de Micobactérias/Instituto Adolfo Lutz; Rua Alberto Sufredini Bertoni, 2325, São José do Rio Preto.
4. Pesquisador do CPqAM/Fio Cruz; Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães; Av Professor Moraes Rego s/n Recife.
5. Professo Doutor FAMERP; CIM /Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; Av Brigadeiro Faria Lima, 5416, São José do Rio Preto.
6. Médica Infectologista e Professora Doutora; FUNFARME; DDIP/Fundação Faculdade Regional de Medicina; Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, São José do Rio Preto.
7. Professora Doutora da UFF; Instituto Biomédico; Universidade Federal Fluminense; Rua Professor Ernani Melo, 101 Niterói, Rio de Janeiro

Autor responsável: Adriana Antônia da Cruz Furini

Rua: Raul de Carvalho, 1658

Bairro: Boa Vista

CEP:15025-300

Cidade: São José do Rio Preto

Email: cruzdri@ig.com.br; adriana@unirp.edu.br

RESUMO

Objetivos: avaliar por meio de criteriosa e crítica revisão bibliográfica a tuberculose e micobacterioses na infância, com ênfase na epidemiologia, aspectos clínicos e ferramentas diagnósticas. **Métodos:** a pesquisa foi realizada nas bases de dados Lilacs, SciELO, PubMed, para o período de 2000 a 2009. Quarenta e seis artigos foram considerados e onze guidelines e manuais nacionais e internacionais. Os descritores utilizados foram: criança, infância, tuberculose, micobactérias atípicas, biologia molecular e diagnóstico. **Resultados:** as crianças portadoras da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* são consideradas por diversos autores como “órfãos da tuberculose”. Várias características dificultam o estabelecimento do diagnóstico definitivo da tuberculose e micobacterioses na infância, entre elas as clínicas com lesões não extensivas, o caráter paucibacilar, as formas latentes, a dificuldade de coleta de espécimes clínicos, as falhas das técnicas da baciloscopia e cultura e a prática rotineira dos países em desenvolvimento de investigar a etiologia tuberculosa após falência terapêutica para patógenos habituais. **Conclusões:** a detecção da micobactéria permanece como confirmação diagnóstica e a oportunidade de investigação do perfil de sensibilidade, favorecendo o tratamento efetivo para qualquer faixa etária independente de seu papel na transmissão da doença. Nesse cenário, assumem maior importância novas estratégias diagnósticas, entre elas a dosagem do interferon-gama e as técnicas de biologia molecular com a promessa de melhor sensibilidade, especificidade e pronta detecção.

Palavras-Chave: Biologia Molecular, Criança, Diagnóstico, Micobactérias Atípicas, Tuberculose.

*Childhood Mycobacterium tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria infection
– A diagnostic challenge*

ABSTRACT

Objectives: evaluate, by careful and critical literature review, the tuberculosis and mycobacteriosis in childhood, with emphasis on epidemiology, clinical features and diagnostic

tools. **Methods:** The study was conducted in the following databases: LILACS, SciELO and PubMed, among the period of 2000 to 2009. Forty-six articles and eleven guidelines/manuals, with national and international publication, were considered. The keywords used were: child, childhood, tuberculosis, atypical mycobacteria, molecular biology and diagnostics. **Results:** Children infected by *Mycobacterium tuberculosis* are considered by many authors as “orphans of tuberculosis”. The establishment of the final diagnosis of tuberculosis and mycobacterial infections in childhood is difficult because several characteristics, including the clinical with not extensive lesions, the paucibacillary nature, the latent forms, the difficulty of collecting clinical specimens, the failures of the smear and culture techniques and practice routine of emergent countries to investigate the etiology of tuberculosis after treatment failure to usual pathogens. **Conclusions:** The detection of mycobacteria remains to be used to confirm the diagnosis and the opportunity to investigate the sensitivity profile, which promotes effective treatment for all age groups independent of their role in disease transmission. In this scenario, new diagnostic strategies have more importance, including the interferon-gamma dosage and the molecular biology techniques, with the promise of better sensitivity, specificity and ready detection.

Descriptors: Molecular Biology, Child, Diagnosis, Mycobacteria Atypical, Tuberculosis

A INFECÇÃO POR MYCOBACTERIUM SPP. NA INFÂNCIA – UM DESAFIO DIAGNÓSTICO

EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE INFANTIL

A Organização Mundial de Saúde (OMS)¹ estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na forma latente.^{2,3,4} A cada ano, nove milhões de casos são notificados e, dois milhões desses morrem em decorrência da patologia.^{1,2,5,6} Dos nove milhões de casos estimados, aproximadamente um milhão ocorre em menores de 15 anos de idade e desses 75% ocorre em vinte e dois países em desenvolvimento

que concentram 80% dos casos. No *ranking* da patologia, o Brasil ocupa a 14^o posição.^{1,6} No Brasil, em 2008 foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 81.660 casos de tuberculose, entre adultos e crianças.⁷

A população menor de 15 anos compõe 11% do total de casos notificados anualmente no mundo, sendo que 8 a 20% das mortes decorrentes de tuberculose ocorrem em crianças.¹ Quarenta por cento dos lactentes infectados, não tratados, evoluem para doença ativa em um a dois anos.⁸ Na faixa etária entre zero a 14 anos a incidência mundial da tuberculose foi de aproximadamente um milhão de casos até o início dos anos 2000. Contudo, convém salientar que os dados nessa faixa etária não são precisos, pois em 80% dos casos o exame de escarro é negativo.⁹ No Brasil, 15% dos casos notificados de tuberculose acometem menores de 15 anos de idade.³ Já no Estado de São Paulo, no ano de 2008, 578 casos foram notificados na faixa etária de zero a 14 anos. Enquanto 115 deles representam a manifestação pulmonar bacilífera, outros 123 também pulmonares tiveram baciloscopia negativa. Um número ainda maior (202 casos) de formas pulmonares teve diagnóstico exclusivamente clínico. Cento e vinte e cinco formas extrapulmonares da patologia foram relatadas no mesmo ano com 13 na forma meníngea.¹⁰ Enquanto a notificação da doença micobacteriana pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* é compulsória, por outro lado, no Brasil o contrário ocorre com as micobacterioses, o que dificulta a busca por registros oficiais com vistas à estimativa acurada das respectivas incidências. Quanto as MNT, protocolos oficiais para a notificação e para a conduta terapêutica no Brasil somente agora começam a ser disponibilizados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, que também elencou dez Centros de Referência Estaduais, para o tratamento desses agentes.

11

O Ministério da Saúde define os municípios como prioritários para o controle da tuberculose entre aqueles que representam 70% de concentração dos casos, totalizando 315 cidades.^{9,12} A cidade de São José do Rio Preto é responsável por quase 50% dos casos notificados na região Noroeste paulista, sendo considerada como prioritária no Programa de Controle da Tuberculose pela alta taxa de pacientes com tuberculose e exame sorológico positivo para o HIV.¹² Porém, as publicações sobre tuberculose e micobacterioses em crianças para essa região são escassas, e ainda, as dificuldades diagnósticas podem corroborar para subnotificação nesses indivíduos.

A TUBERCULOSE NA INFÂNCIA

O *Mycobacterium tuberculosis*, descrito em 1888 por Robert Koch é o agente etiológico da grande maioria dos casos de tuberculose, inclusive na infância.^{13,14} Representa um grande desafio à saúde pública no Brasil e em outros países em desenvolvimento, pois apesar do tratamento ser conhecido e amplamente disponível, a doença continua a apresentar dados epidemiológicos preocupantes.^{5,15} É um bacilo intracelular facultativo, aeróbio estrito, imóvel, e as propriedades peculiares de sua parede celular rica em ceras conferem tempo de geração longo, álcool ácido resistência e sobrevivência incomum aos germicidas e à dessecação.^{7,16} A primo-infecção pelo MT, em sua maioria assintomática, apresenta risco maior de ocorrer na infância, principalmente nas crianças de zero a quatro anos e nas imunocomprometidas.^{1,17} No contexto do controle epidemiológico, as crianças portadoras da tuberculose (TB) são paucibacilares e apresentam lesões não extensivas; resultantes de contato repetido, recente, com um adulto bacilífero e até os cinco anos de idade a transmissão é frequentemente de origem familiar. Convém enfatizar que um terço dos contactantes adultos com tuberculose ativa tem seu diagnóstico efetuado somente após a confirmação da doença na criança, ressaltando falhas na detecção da infecção e para identificação de contactantes e ainda inadequada quimioprofilaxia das formas latentes.^{1,17,18,19} Nelas predomina a forma pulmonar da TB, caracterizada por quadro clínico de irritabilidade, tosse por período superior a três semanas de duração, sudorese noturna e perda de peso.^{15,17} A febre habitualmente é moderada, persistente por mais de 15 dias e frequentemente vespertina, porém a hemoptise é rara.^{8,15} Já as formas extrapulmonares, com sinais e sintomas frequentemente inespecíficos e geralmente paucibacilares, tradicionalmente menos frequentes, vêm ganhando importância nesse grupo etário nos últimos 20 anos, em especial a linfadenite gânglionar periférica (submandibulares e cervicais).^{15,20} No entanto, a pleura e os ossos também são acometidos, com destaque em gravidade para a meningite tuberculosa e a miliar.^{1,15,17} Outras como a tuberculose digestiva peritoneal e intestinal, a pericardite, a geniturinária e a cutânea são raras.¹⁵

A imaturidade do sistema imune, principalmente até o quarto ano de vida, é fator determinante para o risco de desenvolvimento da doença após a infecção por *M. tuberculosis*

em crianças imunocompetentes e ainda parece contribuir para a manifestação clínica peculiar da TB no período infantil.^{1,18} De fato, naquelas com idade inferior a cinco anos, pode ocorrer o desenvolvimento das formas graves como a miliar e a meníngea em menos de três meses após o início da doença.¹⁷

Nas três últimas décadas as infecções por micobactérias não tuberculosas (MNT), agentes de infecções pulmonares e extra-pulmonares, apresentaram crescimento decorrente da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida, com reconhecimento clínico e laboratorial.^{16,20} A partir de 1990, os estudos genotípicos também contribuíram para o reconhecimento das MNTs ou para sua reclassificação, que contribuem para a prevenção e terapêutica adequada.^{16,20,21}

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) podem ser saprófitas, encontradas na água, solo, vegetação, e como parte da microbiota humana, mas também patogênicas ou oportunistas.^{11,16,20,21,22} Nessa direção algumas são agentes etiológicos de infecções de pele e tecidos moles, infecções pós cirúrgicas, como procedimentos estéticos (mesoterapias e lipoescultura), abscessos após injetáveis, associação ao uso de cateteres, pela inoculação direta de ambientes aquáticos, por traumas e feridas cirúrgicas.^{16,22} Distinguem-se do complexo *Mycobacterium tuberculosis* pelas diferenças de habitat, contagiosidade e padrão de susceptibilidade aos antimicobacterianos.¹⁶ Devido à ampla distribuição ambiental e a participação como colonizante humano, a definição de infecção por MNT deve ser avaliada com cautela, por meio de critérios pré-estabelecidos pela American Toracic Society.^{8,11,16,20} Além disso, a contaminação das culturas por essas bactérias também pode trazer dificuldade na interpretação de seu papel como patógeno humano.^{16,21} A linfadenite cervical é considerada a forma mais comum de infecção por MNTs em crianças de um a cinco anos, e os linfonodos mais atingidos são os submandibulares, convém salientar a importância do diagnóstico diferencial entre a infecção causada por MT e MNT ou complicações da Vacina BCG.¹¹ O *Mycobacterium avium* é o agente mais prevalente nas linfadenites em crianças, no entanto outras MNTs que causam essa infecção em criança são *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*.²³ Outro tecido também comumente afetado no período infantil é a pele.¹⁶

A infecção pelo HIV é uma condição relacionada ao alto risco de tuberculose, por *Mycobacterium tuberculosis* e micobacterioses por MNT.^{18,24,25} O comprometimento da imunidade no HIV/AIDS é o principal fator de risco para tuberculose ativa.^{13,14,25} Na cadeia de transmissão o evento comum é a criança soropositiva para o HIV/doente de

AIDS ser contaminada pelo bacilo disseminado por adultos bacilíferos.¹³ Na co-infecção TB/HIV, o diagnóstico é difícil e há alta susceptibilidade para forma ativa da tuberculose com rápida progressão para óbito por supressão imune.²⁶ Nas crianças infectadas pelo HIV, a TB é considerada a maior causa de morbimortalidade.¹³

Enquanto as crianças imunocompetentes infectadas pelo bacilo, indicado por um Teste de Sensibilidade a Tuberculina (TST) positivo têm 10% de chance de desenvolver a forma ativa ao longo da vida, nos indivíduos infectados pelo HIV, sem intervenção terapêutica, essa probabilidade é de cerca de 10% ao ano.²⁷ Desta maneira prevenir a tuberculose-doença na criança HIV positiva já infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* é de fundamental importância, e tem como objetivo a rápida instituição da terapia anti-retroviral, o diagnóstico e o tratamento (quimioprofilaxia) da infecção tuberculosa latente em indivíduos infectados pelo HIV.^{1,27} O tratamento da infecção tuberculosa latente em crianças portadores do HIV sabidamente previne o desenvolvimento da tuberculose nesses indivíduos de forma significativa, assim o diagnóstico por meio do teste tuberculínico a partir dos dois anos de idade e o tratamento efetivo fazem parte das recomendações nacionais do Ministério da Saúde desde 2000.^{15,28}

A vacina de Calmette-Guérin (BCG), em uso desde 1921, baseia-se em uma variedade atenuada do *Mycobacterium bovis* e é, ainda, a medida mais eficaz para prevenção da doença grave da criança, mas incapaz de impedir o surgimento da TB pulmonar ao longo de seu desenvolvimento.^{29,30,31} No Brasil, a imunização foi adotada desde 1976 para todos os recém nascidos menores de um ano de idade e a OMS recomenda a imunização ao nascer para as crianças de países com alta prevalência de tuberculose. Uma ressalva refere-se às crianças infectadas pelo HIV, dado o risco da BCG doença.^{15,30} Convém salientar que a cicatriz decorrente da reação celular local pós-vacinação é utilizada como marcador de eficácia, muito embora aproximadamente 10% das crianças eficazmente imunizadas pela BCG não mostrarem tal manifestação cutânea.³¹

DESAFIOS DIAGNÓSTICOS

As crianças portadoras da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* são consideradas por diversos autores como “órfãos da tuberculose”.^{13,14} De fato, a dinâmica de interação do bacilo de Koch com o hospedeiro humano em tenra idade é bastante peculiar em suas manifestações o que impacta, diretamente, o seu diagnóstico.^{3,14} Além

disso, as crianças pouco contribuem para disseminação da doença na comunidade, o que diminui a atenção dos programas de controle da TB quanto ao diagnóstico e profilaxia da TB infecção nessa população.^{3,18,32} Contudo, a infecção tuberculosa latente infantil requer abordagens precoces para evitar as formas graves bem como para prevenir a TB pulmonar. Infelizmente, a prática atual nos países em desenvolvimento é inversa, ou seja, somente após doença pulmonar não responsiva ao tratamento antibacteriano de eleição contra patógenos habituais, a etiologia tuberculosa é considerada.^{15,17,24,32}

O diagnóstico de TB na infância, segundo preconizado pela OMS, enfatiza a importância da compatibilidade entre achados clínicos, radiológicos, dados epidemiológicos (contato prévio com adulto que tenha resultado de baciloscopia positiva ou negativa, mas com cultura positiva), sintomas sugestivos, Teste de Sensibilidade a Tuberculina (TST) positivo, microscopia de escarro positiva quando possível exame para o HIV, idade inferior a cinco anos e a má nutrição severa, sendo todos considerados como fatores que acrescem o risco.^{1,9}

No Brasil, desde 2002, tal associação é recomendada pelo Ministério da Saúde em forma de sistema de pontuação em crianças e adolescentes com baciloscopia negativa. A limitação dessa estratégia está ligada ao fato de que o Brasil possui alta incidência de co-infectados TB-HIV, isso por que é freqüente a ausência de um quadro clínico específico, de imagens radiológicas compatíveis com a doença, além de baixa sensibilidade da baciloscopia e TST dependente de outros resultados.^{3,9,15,19}

Embora o quadro clínico seja essencial para o diagnóstico da tuberculose e micobacterioses, a detecção da micobactéria permanece como confirmação diagnóstica e oportunidade de investigação do perfil de sensibilidade, favorecendo o tratamento efetivo.¹⁵ Rotineiramente, o diagnóstico laboratorial da tuberculose e das micobacterioses é realizado por técnicas fenotípicas.^{11,15} A baciloscopia de escarro é um método direto, não-invasivo, rápido e econômico, que requer de 5000 a 10000 bacilos por mililitro de amostra clínica. Assim, tem sensibilidade limitada para a detecção das formas paucibacilares da TB, sendo

indicada somente a partir dos cinco anos. Dessa maneira, vários estudos testam novas metodologias para aumentar a freqüência de detecção dessas formas com pequena quantidade de bacilos, que acometem principalmente pacientes imunocomprometidos e crianças, em especial nos sítios extrapulmonares.^{1,3,15,17,33} Em áreas endêmicas, a microscopia do escarro é utilizada freqüentemente como único teste laboratorial para

diagnóstico da TB na infância, apesar de ser positiva em menos de 10 a 15% dos casos.^{13,32}

A cultura, considerada “gold standard” para o diagnóstico da tuberculose e de suas formas extrapulmonares apresenta maior sensibilidade, com detecção de 10 micobactérias por mililitro de escarro. Contudo, tal vantagem é comprometida para amostras paucibacilares e, ainda, requer de 6 a 8 semanas para a visualização de colônias, o que prolonga o diagnóstico definitivo da doença. Ademais, somente realizam a cultura um número limitado de laboratórios autorizados.^{11,15,26,33,34,35,36,37} Nessa direção, por exemplo, a confirmação em crianças ocorre de 30% a 50% dos casos de TB.^{15,19,26,36,37} Convém salientar outros dois inconvenientes dessa metodologia, relacionados à diminuição da viabilidade micobacteriana: a amostra pode sofrer contaminação durante o pré tratamento e resultados falso negativos podem ocorrer em pacientes sob terapia medicamentosa.³⁵ Por outro lado, as técnicas de biologia molecular, diferentemente da baciloscopia e cultura, são teoricamente capazes de detectar uma única cópia de ácido desoxirribonucleico (DNA) de qualquer organismo.³³

Colabora para a dificuldade de confirmação laboratorial da TB infantil, a dificuldade de expectoração voluntária de escarro. Assim a amostra clínica de escolha é o lavado gástrico, com característica dificuldade de coleta devido à necessidade de internação da criança.^{15,17,19,29} Desta maneira a baixa sensibilidade das técnicas fenotípicas contribui para a manutenção da forma assintomática ou latente da infecção, com aproximadamente 10% de risco para o estabelecimento da forma ativa.⁴

Associado aos recursos laboratoriais, o teste cutâneo da tuberculina (TST) ou intradermorreação, ainda permanece como uma das ferramentas mais utilizadas para o diagnóstico das crianças recentemente expostas a adultos com diagnóstico da doença e para os casos de tuberculose latente.^{14,29,38} Apesar de sua grande utilização, esse teste apresenta limitações como a baixa especificidade e ainda pode acarretar em efeito ‘boosting’ e reações falso positivas decorrentes da vacina de Calmette-Guerrin (BCG) e por contato prévio com

micobactérias não tuberculosas.^{4,29,38} As doenças imunossupressoras ou medicamentos imunodepressores, a infecção pelo HIV, a desnutrição, a vacinação recente com vírus vivos (sarampo, varicela), a insuficiência renal crônica, as grandes queimaduras, a administração inadequada, os erros de leitura além de outros relacionados à própria qualidade da tuberculina podem ser responsáveis pelos resultados falso negativos. Ainda,

o TST fornece resultado positivo apenas após três meses de contato com o agente etiológico, período em que pode ocorrer conversão da forma latente para ativa, principalmente em crianças.^{21,29,38,39}

Lacunas importantes são deixadas por tais recursos no que se refere à determinação de infecção por *Mycobacterium* spp. em crianças e em alguns pacientes/sítios com dados epidemiológicos cada vez mais relevantes.^{4,22} Nesse cenário, assumem maior importância novas estratégias diagnósticas, entre elas as técnicas moleculares com a promessa de melhor sensibilidade, especificidade e pronta detecção.^{4,13,17,22,34,35} Assim, é premente a necessidade de técnicas que detectem qualquer número de micobactérias presentes em diferentes amostras clínicas suspeitas e, se possível, que confirmem a espécie em curto período de tempo, independentemente da faixa etária.³⁴

Por essa razão, recentemente, ensaios laboratoriais baseados em outras estratégias diagnósticas vêm sendo testados, entre eles a dosagem do interferon-gama além de diferentes ferramentas moleculares.^{5,40} O diagnóstico imunológico, conhecido como QuantiFERON-TB-Gold e ELISPOT, dentre outros ensaios imunoenzimáticos, são fundamentados na produção do interferon-gama por linfócitos T, e permitem determinar a sensibilização prévia do paciente por micobactérias além de confirmar infecção recente. Como vantagem não sofre interferência da vacinação prévia pela BCG e nem por *M. bovis*, já que os antígenos ESAT-6 e CFP-10 são exclusivos de MT. Apesar das vantagens em relação ao TST, seu resultado positivo pode significar sensibilização prévia, mas não necessariamente doença ativa.⁵ Adicionalmente, os estudos em crianças são pequenos e limitados o que impede sua liberação como recurso diagnóstico.^{13,32,39}

Assim, outra proposta diagnóstica bastante explorada são os métodos moleculares baseados na PCR, tanto os métodos “*in house*” como comerciais. Neles, várias seqüências alvo e conjuntos de oligonucleotídeos, assim como diferentes amostras clínicas são testadas.^{19,40} A detecção direta de *M. tuberculosis* em amostras clínicas por técnicas

moleculares, possui duas metodologias aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA): o Teste Amplicor *M. tuberculosis* (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ) e Enhanced *M. tuberculosis* Direct Test (E-MTD; Gen-Probe, San Diego, CA). O INNO-LIPA *Mycobacteria* é outro kit disponível (Innogenetics, Ghent, Belgium), com

análise baseada na hibridização reversa utilizando a região 16S-23S RNAr de micobacterias.⁴¹

As metodologias que utilizam a PCR-RFLP foram desenvolvidas para vários genes micobacterianos como o *hsp65*, o mais frequentemente investigado, a região intergência 16S-23S DNAr (ITS) e o *rpoB*.^{42,43,44} Os procedimentos que associam duas PCR, conhecidos como Nested PCR (NPCR) conciliam maiores sensibilidade e especificidade e a sequência de inserção IS6110, e provavelmente o alvo mais estudado^{25,43,45}. Porém, estudos já demonstram a presença da sequência de inserção IS6110 em MNT e tem sido reportadas, cepas de MT com ausência ou presença de poucas cópias dessa região genômica.^{46,47,48} A NPCR fundamenta-se na utilização de dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores em reações subseqüentes, cujo produto de amplificação da primeira é utilizado como molde para segunda, com a vantagem de diluição dos componentes inibidores que podem estar presentes nas amostras biológicas.^{19,43}

Embora a NPCR seja considerada altamente sensível, a desvantagem é decorrente da necessidade da abertura do tubo após a primeira amplificação para transferência do produto para segunda reação, assim nesse processo aumenta-se o risco de contaminação de amostras negativas com amplicons de amostras positivas.⁴⁹ Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e diminuir o potencial de contaminação, a PCR realizada em um único tubo (PCR *In-tube*) não necessita de abertura do tubo até o estágio de análise dos amplicons, após a finalização da reação, assim apenas os oligonucleotídeos internos precisam ser seqüestrados, sendo esses oligonucleotídeos imobilizados na face interna da tampa do microtubo, com fácil dissolução na mistura de reação para participar da segunda etapa de amplificação por meio da inversão do tubo.⁴⁹

Ainda, as técnicas que utilizam a PCR Multiplex têm a vantagem de diferenciação das espécies facilitando a escolha da terapia adequada e ainda podem ser utilizadas para a rápida detecção de micobactérias resistentes.³⁴ Bhattacharya et al³⁴ (2003) utilizaram uma *Multiplex* PCR baseada na amplificação de fragmentos de 165, 365 e 541 pb a partir do gene *hsp65*, que codifica o antígeno 65 kDa, da região *dnaJ* de micobactéria e do elemento de inserção *IS6110*

de *Mycobacterium tuberculosis*. O gene *hsp65* codifica o antígeno de 65kDa que é uma proteína altamente imunorreativa do gênero *Mycobacterium* e o gene *dnaJ* codifica uma proteína de estresse que é altamente conservado entre *M. tuberculosis* e *M. avium*, mas não em outras MNTs.³⁴

Ademais a PCR é o método de escolha para o diagnóstico da tuberculose em casos em que a baciloscopia é negativa, formas assintomáticas, origem de caso não identificado, ou não contactante na moradia, mas em que há suspeita clínica para a patologia.^{13,17,34,47} Outras vantagens são a utilização como ferramenta auxiliar no diagnóstico das formas meníngeas e miliar de maior gravidade e mais frequentes em crianças, além de ser positiva em pacientes sob terapêutica antimicobacteriana.^{34,50}

Dessa maneira, os resultados da biologia molecular, associada ao diagnóstico clínico, incluindo cuidadosa anamnese, fenotípico quando possível, e outras ferramentas como TST e Raios-X de tórax colaboram para o início do tratamento específico, reduzindo a gravidade da doença e colaborando para detecção do adulto infectante, já que a transmissão para criança é evidência de recente e repetitivo contato com adulto tuberculoso.^{18,19,43}

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children. Geneva: WHO; 2006. [citado 2009 jul 25]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_HTM_TB_2006.371_eng.pdf
2. Centers for Disease Control And Prevention. Tuberculosis. Data and Statistics, 2009. [citado 2009 jun 20]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/statistics/default.htm>
3. Maciel ELN, Dietze R, Silva RECF, Hadad DAVID J, Struchiner CJ. Avaliação do sistema de pontuação para o diagnóstico da tuberculose na infância preconizado pelo Ministério da Saúde, Brasil. *Cad. Saude Publica*. 2008; 24(2): 402-08.
4. Van-Lume DS, De Souza JR, Melo WG, et al. Preliminary results in the immunodiagnosis of tuberculosis in children based on T cell responses to ESAT-6 and PPD antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(4): 401-04.
5. Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J Bras Pneumol*. 2007; 33(3): 323-24.
6. World Health Organization. Global Tuberculosis Control – epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO; 2009. Report 2009: Chapter 1: Epidemiology [citado 2009 ago 14]. Disponível em: www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/tbu_9.pdf
7. Brasil. Agravos de Notificação - Sinan Net. Casos confirmados por Ano Diagnóstico segundo Ano. Brasília: 2008. [citado 2009 mar 10]. Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>.

8. American Thoracic Society. Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. *Am J Respir Crit Care Med*; New York. 2007; 175: 367-16.
9. Sant'Anna CC, Hijjar MA. Recent contribution of the World Health Organization to control childhood tuberculosis. *Rev Saude Publica*. 2007; 41(suppl. 1): 117-20.
10. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Controle da Tuberculose CVE-SES/SP. Tb em números. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2008. [citado 2009 mar 15]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/TB/tb_num/tb_cn08.htm
11. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Tuberculose. Coordenadoria de Controle de Doenças. Micobacterioses. Recomendações para o diagnóstico e tratamento (Manuscrito sujeito à revisão) São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2005. [citado 2009 ago 31]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/MNT_Final_9-12-05a.pdf
12. Vendramini SHF, Gazetta CE, Chiaravalotti NF, Cury MR, Meirelles EB, Kuyumjian FG. et al . Tuberculose em município de porte médio do Sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade, de 1985 a 2003. *J Bras Pneumol*. 2005; 31(3): 237-43.
13. Marais BJ, Pai M (a). New approaches and emerging technologies in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Paediatric Respir Rev*. 2007; 8(2): 124-33.
14. Rigouts L. Clinical practice: Diagnosis of childhood tuberculosis. *Eur J Pediatr*. 2009; 168(11): 1285-90.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. [citado 2009 set 22]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_tuberculose.pdf
16. Piersimoni C, Scarparo C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8(5): 323-34.
17. Herranz M, Bernaola E. Características de la enfermedad tuberculosa en la infancia Clinical characteristics of tuberculosis in childhood. *An Sist Sanit Navar*. 2007; 30(Supl. 2): 117-29.
18. Duarte R, Tavares E, Miranda A, Carvalho A. Tuberculosis in a child – search for the infected adult nearby; case report, Portugal, 2007. *Euro Surveill*. 2009; 14(36): 1-3.

19. Lima JFCL, Montenegro LML, Montenegro RA et al. Performance of nested PCR in the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of pediatric patients. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(7): 690-97.
20. Thomson RM, Yew WW. When and how to treat pulmonary non-tuberculous mycobacterial diseases. *Respirology*. 2009; 14(1): 12-6.
21. Ueki SYM, Martins MC, Telles MAS et al . Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med*. 2005; 41(1): 1-8.
22. Castro CM, Puerto G, García LM, et al. Identificación molecular de micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción, Colombia 1995-2005. *Biomedica*. 2007; 27(3): 439-46.
23. Thergerstrom J, Friman V, Nylen O, Romanus V, Olsen B. Clinical features and incidence of *Mycobacterium avium* infections in children. *Scand J Infect Dis*. 2008; 40 (6-7): 481-86.
24. Boule A, Eley B. Comentario: reducing HIV-associated tuberculosis in children. *Int J Epidemiol*. 2009; 1-2.
25. Lannoy LH, Escalante JJC, Evangelista MSN, Romero GAS. Tuberculosis incidence and risk factors among patients living with HIV/AIDS in public health service institutions in Brasilia, Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(6): 549-55.
26. Ramírez-Cardich ME, Kawai V, Oberhelman RA, Bautista CT, Castillo ME, Gilman RH. Clinical of tuberculosis co-infection in HIV-infected children hospitalized in Peru. *Int J of Infect Dis*. 2006; 10(4): 278-81.

27. Jamal LF, Moherdau F. Tuberculosis and HIV infection in Brazil: magnitude of the problem and strategies for control. *Rev Saude Publica*. 2007; 41(sup11): 104-10.
28. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Crianças e Adolescentes Infectados pelo HIV: manual de bolso. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS Brasília: Ministério da Saúde, 2009. [citado 2009 mai 7]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments>
29. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adult and children. *Am J Respir Crit Care Med*; New York. 2000; 161: 1376-95.
30. Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto ML. Vacina BCG contra *tuberculose*: efeito protetor e políticas de vacinação. *Rev Saude Publica*. 2007; 41(sup11): 59-6.

31. Pérez-Then E, Shor-Posner G, Crandall L, Wilkinso J. The relationship between nutritional and sociodemographic factors and the likelihood of children in the Dominican Republic having a BCG scar. *Rev Panam Salud Publica*. 2007; 21(6): 365-72.
32. Marais BJ, Pai M (b). Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Arch Dis Child*. 2007; 92: 446-52.
33. Rodrigues MAV, Serafini AB, Pereira MS et al. Standardization of in-house Polymerase Chain Reaction for the Identification of Mycobacterium tuberculosis at the Reference Tropical Disease Hospital in the State of Góias, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(4): 415-19.
34. Bhattacharya B, Karak K, Ghosal AG et al. Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Trop Med Int Health*. 2003; 8(2): 150-7.
35. Cho CH, Han SH, Chin BS et al. Diagnosis and species identification of Mycobacterial infections by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of sterile body fluids. *Korean J Intern Med*. 2009; 24(2): 135-38.
36. Norlijah O, Intan HI, Feizel AMF, Kasim MS, Noh LM. Case reports: Near miss diagnosis of childhood tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37(5): 953-57.
37. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3(10): 624-32.
38. Cascante JA, Pascal I, Erguía VM, Hueto J. Diagnosis of tuberculosis infection. *An Sist Sanit Navar*. 2007; 30(Supl. 2): 49-65.
39. Petrucci R, Amer NA, Gurgel RQ, et al. Interferon-gamma, Interferon gamma-inudecd-protein 10, and tuberculin responses of children at high risk of tuberculosis infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; 27(12): 1073-77.
40. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Rev Saúde Pública*. 1999; 33(3): 281-86.
41. Chemlal KC, Portales F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis*. 2003; 16: 77-3.
42. Wong D, Yip PC, Cheung DT, Kam, KM. Simple and rational approach to the identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex species, and other commonly isolated mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(10): 3768-71.

43. Assis NCS, Lopes ML, Cardoso NC, Costa MM, Souza CO, Lima KVB. Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43(1): 1-7.
44. Kurabachew M, Enger O, Sandaa R, Skuce R, Bjorvatn B. A multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group -, and species-specific detection of mycobacteria. *Diagn Mycobiol Infec Dis.* 2004; 49 (2): 99-104.
45. Mc Evoy CRE, Falmer AA, Pittius NCG, Victor TC, Helden PD, Warren RM. The role of *IS6110* in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2007; 87: 393-404.
46. Nava Paz O, Hassanhi M, Prieto L. Evaluación de la baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. *Kasmera.* 2005; 33(2): 119-131.
47. Sekar B, Selvaraj L, Alexi A, Ravi S, Arunagiri K, Rathinavel L. The utility of IS6110 sequence based polymerase chain reaction in comparison to conventional methods in the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Microbiol.* 2008; 26(4): 352-55.
48. Thong-On A, Smittipat N, Juthayothin T et al. Variable-number tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 in Thailand. *Tuberculosis.* 2009; Article in press.
49. Abath FG, Melo FL, Werkhauser RP, Montenegro L, Montenegro R, Schindler HC. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. *BioTechniques.* 2002; 33(6): 1210-14.
50. Gómez-Pastrana D. Tuberculosis in children – is PCR the diagnostic solution? *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8: 541-44.

ARTIGO II
TUBERCULOSE E MICOBACTERIOSES NO PORTADOR DO HIV – UMA
INTERAÇÃO SINGULAR

TUBERCULOSIS AND MYCOBACTERIOSIS AMONG HIV
SEROPOSITIVE PATIENTS – A UNIQUE INTERACTION

Furini, Adriana Antônia da Cruz^{1,2}; Pedro, Heloisa da Silveira Paro²; Arlindo Schiesari Júnior³; Machado, Ricardo L. Dantas⁴; Rossit, Andrea Regina Baptista⁴.

1. Especialista, docente do Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, Mestranda em Ciências da Saúde pela FAMERP; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; Av Brigadeiro Faria Lima, 5416 São José do Rio Preto.
2. Pesquisador Mestre do IAL; Setor de Micobactérias/Instituto Adolfo Lutz; Rua Alberto Sufredini Bertoni, 2325 São José do Rio Preto.
3. Especialista, docente das Faculdades Integradas Padre Albino de Catanduva, São Paulo, Mestrando em Ciências da Saúde pela FAMERP; CIM /Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; Av Brigadeiro Faria Lima, 5416 São José do Rio Preto.
4. Doutor, docente da FAMERP; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; Av Brigadeiro Faria Lima, 5416 São José do Rio Preto.

Autor responsável: Adriana Antônia da Cruz Furini

Centro Universitário de Rio Preto- UNIRP

Rua Raul de Carvalho, 1658, Boa Vista, 15025-300

São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Telefone: 17 – 32013360

E mail: adriana@unirp.edu.br

RESUMO

Esse artigo apresenta atualização sobre aspectos únicos das doenças por *Mycobacterium* spp. entre os portadores do HIV, em especial sobre suas características clínicas, terapêutica e diagnóstico laboratorial. A infecção pelo HIV eleva o risco da tuberculose quer seja por reativação de formas latentes ou por primo-infecção, considerado o principal fator de risco para tuberculose doença, e essa é responsável por um terço dos óbitos nesses pacientes. Adicionalmente, as micobacterioses ganharam “*status*” de agentes oportunistas, desde que infecções atípicas provocadas por esses agentes foram identificadas em portadores da Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS). Devido à natureza paucibacilar da doença micobacteriana nos portadores do HIV/AIDS, há dificuldade para a confirmação diagnóstica desses agentes pelas técnicas fenotípicas de baciloscopia e cultura. Assim, novas estratégias diagnósticas assumem maior importância, entre elas, as técnicas moleculares, com promessa de melhor sensibilidade, especificidade e pronta detecção em qualquer espécime clínico. Embora o quadro clínico seja essencial para o diagnóstico da tuberculose e micobacterioses, a detecção da micobactéria permanece como confirmação diagnóstica e oportunidade de investigação do perfil de sensibilidade, favorecendo o tratamento efetivo.

PALAVRAS-CHAVE: Tuberculose, Micobactérias atípicas, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, Biologia Molecular, Diagnóstico.

ABSTRACT

This paper presents an update on the unique aspects of the *Mycobacterium* spp. disease among HIV patients, particularly on its clinical features, therapeutic and laboratory diagnosis. HIV infection increases the risk of tuberculosis either by reactivation of latent forms or primary infection, which is considered the main risk factor for tuberculosis disease, and this accounts for one third of deaths in these patients. In addition, the mycobacteriosis received the “status” of opportunistic agents, since atypical infections caused by these agents were identified in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Because of the paucibacillary nature of mycobacterial disease in HIV/AIDS patients, the diagnostic confirmation of these agents by phenotypic techniques of microscopy and culture is difficult. Thus, new diagnostic strategies assume greater importance, among them, molecular techniques, with the promise of better sensitivity, specificity and ready detection in any clinical specimen. Although the typical clinical presentation is essential for the tuberculosis and mycobacteriosis diagnosis, the detection of mycobacteria remains to be the diagnostic confirmation and the opportunity to investigate the sensitivity profile, promoting effective treatment.

KEY-WORDS: Tuberculosis, Mycobacteria Atypical, Acquired Immunodeficiency Syndrome Molecular Biology, Diagnosis.

1 A TUBERCULOSE

Apesar de manifestações clínicas milenares, tratamentos cento por cento efetivos e a vacina de Calmette-Guérin (BCG), mesmo que protetora somente na infância, a tuberculose (TB) mantém-se nos dias atuais como sério problema de saúde pública, associada a níveis socioeconômicos, dificuldade de acesso aos serviços de saúde, envelhecimento populacional, deficiências de controle, além da não adesão ao esquema terapêutico pelos portadores e contactantes (American Thoracic Society, 2007; Brasil, 2002; Lindoso & Lindoso, 2009). A epidemia da AIDS e o aumento progressivo de bacilos multiresistentes são fatores adicionais a gravidade da doença no mundo, apesar da TB ser uma doença curável na maioria dos casos (Lannoy et al., 2008, Lindoso & Lindoso, 2009).

2 EPIDEMIOLOGIA TB/HIV

A nível mundial, em 2006 foram notificados para TB 9,0 milhões de casos e 1,7 milhões de mortes. Nesse mesmo ano a co-infecção do HIV/TB foi descrita para 0,7 milhões de pessoas e 13% das mortes em soropositivos para o HIV foram decorrentes da TB (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2009; Gopinath & Singh, 2009). Os dados epidemiológicos apontam para uma concentração de, aproximadamente 75% dos casos de TB em vinte e dois países, dos quais o Brasil ocupa a 14^o posição (Lindoso & Lindoso, 2009; Organización Panamericana de la Salud, 2008; World Health Organization - WHO, 2009a).

Nas Américas, a infecção pelo HIV é um dos fatores que fazem desse continente a segunda maior área em casos de TB, com representativo número de mortes e custos para o sistema público de saúde (Organización Panamericana de la Salud, 2008). Em 2007, no Brasil observou-se que para cada 100.000 habitantes 39,3 apresentaram tuberculose, e desses apenas 20,2 apresentaram baciloscopia positiva, enquanto que nesse ano a incidência da AIDS foi de 17,7 e a co-infecção HIV/TB de 8141 casos (Cheade et al., 2009; Nunes et al., 2008; Organización Panamericana de la Salud, 2009; WHO, 2009b). No país, em 2008, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 81.660 casos de TB (Brasil, 2008a), dos quais 19.024 casos ocorreram no Estado de São Paulo (São Paulo, 2009). Adicionalmente, de 1980 a 2009 foram registrados 179.403 casos de AIDS, para esse estado (Brasil, 2009).

No panorama Nacional a cidade de São José do Rio Preto, localizada na região Noroeste do Estado de São Paulo, é considerada como prioritária no Programa de Controle da Tuberculose pela alta taxa de pacientes com tuberculose e exame sorológico positivo para o HIV, com notificação em 2008 de 45 casos da co-infecção HIV/TB (São Paulo, 2009; Vendramini et al., 2005).

3 CARACTERÍSTICAS DA CO-INFECÇÃO HIV/TB

A infecção pelo HIV é considerada um dos principais fatores de risco para tuberculose e micobacterioses. Cinquenta por cento dos soropositivos para o HIV desenvolve infecções micobacterianas ao longo de suas vidas e a TB consiste em uma das principais causas de morbidade e mortalidade no

soropositivo para o HIV, com taxas de um terço das mortes nos doentes de AIDS (Lannoy et al., 2008; Lindosos & Lindoso, 2009; Murcia et al., 2007; Nunes et al., 2008) . A tuberculose, tal como as infecções causadas por patógenos intracelulares obrigatórios requer uma efetiva resposta imune celular para seu controle, com importante função dos linfócitos TCD4⁺ contra a micobactéria (Davoudi, et al; 2008). Dessa maneira a imunossupressão, com depleção desses linfócitos, contribui na susceptibilidade para infecção pelo *M. tuberculosis* com rápida progressão para doença ativa e 10% de risco de reativação de formas latentes ao ano nos soropositivos para o HIV (CDC, 2009; Cheade et al., 2009; Conde, et al., 2009; Davoudi, et al; 2008; Kibiki et al., 2009; Murcia et al., 2007). Nesse contexto, a quimioprofilaxia da infecção tuberculosa latente em portadores do HIV sabidamente previne o desenvolvimento da tuberculose doença de forma significativa (Brasil, 2002; Jamal & Moherdai, 2007).

A magnitude clínico-epidemiológica da co-infecção HIV/TB, fez com que em 1993, a OMS incluísse a tuberculose como condição definidora de AIDS nos infectados pelo HIV (Lemos, 2008). As manifestações clínicas da TB nos soropositivos para o HIV dependem do grau de imunodeficiência, assim o nível de linfócitos TCD4⁺ nos soropositivos para o HIV/AIDS é um preditor dessas manifestações, na qual abaixo de 200 células/mm³, o padrão clínico em geral é inespecífico, com chances de micobacteremia, apresentações radiológicas atípicas e achados histopatológicos com ausência ou má formação do granuloma (Bacha et al., 2004; CDC, 2009; Lemos, 2008). Ainda, a imunossupressão profunda, com níveis de linfócitos TCD4⁺ abaixo de 50 células/ mm³ predispõe às formas extrapulmonares, com bacteremia,

destacando-se a linfadenite, pleurite, pericardite e meningite (CDC, 2009; Lemos, 2008, WHO ,2007).

A carga viral destaca-se como outra condição laboratorial importante no acompanhamento do soropositivo para o HIV. A elevação transitória desse parâmetro, assim como a diminuição da contagem de células TCD4⁺, é comum em pacientes com co-infecção HIV/TB (Brasil, 2008b).

4 O MYCOBACTERIUM SPP. E O HIV/AIDS

As espécies do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M.bovis-BCG*, *M. africanum*, *M. microtti*), as micobacterias não tuberculosas (MNTS), e *M. leprae* compõem o gênero *Mycobacterium* (Ueki et al., 2005). O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da grande maioria dos casos de tuberculose (Ferraz et al., 2006). No entanto, a epidemia AIDS e o advento das modernas técnicas moleculares, fizeram com que nas três últimas décadas as infecções por MNTs, denominadas micobacterioses, apresentassem crescimento com reconhecimento clínico e laboratorial, e reclassificação (Banerjee, 2005; Murcia et al., 2007; Gopinath e Singh, 2009, Piersimoni & Scarparo, 2008). Assim, a classificação correta desses agentes, que acometem sítios pulmonares, extra-pulmonares e infecção disseminada possibilita a prevenção, controle e terapêutica adequada (Piersimoni & Scarparo, 2008; São Paulo, 2005; Ueki et al., 2005).

O grupo de MNTs é composto por 125 espécies e 11 subespécies descritas até o momento, divididas em crescimento lento e rápido, adicionalmente diferem do complexo *M. tuberculosis*, devido ao lento isolamento em cultura desses últimos, e também por: *habitat* já que as MNTS

podem ser saprófitas, patogênicas ou oportunistas, pela transmissão e pelo padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos. Nos soropositivos para o HIV predominam as MNTs de crescimento lento (American Thoracic Society, 2007; Brasil, 2008b; Piersimoni & Scarparo, 2008 São Paulo, 2005; Ueki et al., 2005). A distribuição ambiental e sua situação em alguns casos como colonizante, tornam a definição como doença dependente de critérios estabelecidos pela American Thoracic Society (Piersimoni & Scarparo, 2008; São Paulo, 2005). De acordo com esses critérios são definidos como agentes etiológicos de micobacterioses quando: um isolamento a partir de sítio estéril e/ou de três sítios não estéreis, obtidos a partir de culturas puras e abundantes, além da presença de sinais clínicos compatíveis (American Thoracic Society, 2007; Assis, et al., 2007; Piersimoni & Scarparo, 2008).

Apesar da notificação da doença micobacteriana pelo complexo *M. tuberculosis* ser compulsória, tal fato para as micobacterioses, data de 2005 por meio de registros disponibilizadas pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (São Paulo, 2005). No entanto, levantamentos realizados nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do país mostraram ampla variação entre oito a 59% nas taxas de isolamento dessas bactérias, entre os soropositivos para o HIV Cheade et al., 2009).

Estudos realizados na região Sudeste do Brasil, (1993), detectaram de 15 a 20% de MNTs, já no Rio de Janeiro (1997), foram detectados 37% de complexo *Mycobacterium Avium* (MAC) em hemoculturas de indivíduos com sorologia positiva para o HIV. Para o Estado de São Paulo de 1991-1997 as cepas de MNTs mais isoladas foram *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium. kansasii* (Ueki, et al., 2005). No município de São José do Rio Preto, apenas

um estudo refere-se à ocorrência desses agentes, que aborda os anos de 1996 a 2005, com descrição de 317 cepas de MNTs isoladas, com predomínio de *M. avium* em soropositivos para o HIV (34%) (Pedro et al., 2008). A micobacteremia pelo complexo *M. avium* tem sido reportada em todos os continentes, e é mais freqüente em soropositivos para o HIV, nos quais a doença disseminada é potencialmente fatal (Gopinath & Singh, 2009). Porém, convém salientar que apenas 12% dos pacientes detectados com o complexo *M. avium* apresentam cultura de sangue positiva, e ainda que o *M. tuberculosis* em tal amostra é menos freqüente, em contra partida taxas de 49% de positividade desse agente em sangue também são descritas na literatura, quando os linfócitos TCD4⁺ estão abaixo de 100 células/mm³ (Nakatani, 2005).

De fato, dentre as MNTs, potencialmente patogênicas, o complexo *M. avium-intracellulare* é o agente mais comumente envolvidos nas formas disseminadas da doença em soropositivos para o HIV, com freqüência aumentada em contagens de linfócitos TCD4⁺ menores que 100 células/mm³ (Barnes, et al., 2004; Castro et al., 2007, Gopinath & Singh, 2009; Murcia et al., 2007; Pedro et al., 2008; Saad et al., 2009, São Paulo, 2005; Ueki, et al., 2005). No entanto, outras espécies de MNTs, destacam-se entre aquelas que causam doença nos soropositivos para o HIV/AIDS, principalmente nas formas disseminadas tais como *M. kansasii* e *M. genavense* (Castro, et al., 2007; São Paulo, 2005).

5 Considerações sobre a terapêutica da Doença Micobacteriana e o HIV/AIDS

No Brasil, a terapia antirretroviral de alta potência (*Highly Active AntiRetroviral Treatment* - HAART), disponível desde 1996, tem sido associada a um declínio da mortalidade por micobactérias nos soropositivos para o HIV, com modificações nas características clínicas do paciente co-infectado TB/HIV (Lannoy et al., 2008; Lindoso & Lindoso, 2009; Nakatani, 2005; United States of America, 2009). A HAART, ao gerar melhora significativa da resposta imune e do processo inflamatório desses pacientes, pode favorecer o aparecimento ou exacerbar as manifestações clínicas da tuberculose, devido à forte reação inflamatória nos locais da infecção; esta situação onde as manifestações clínicas são decorrentes da recuperação imunológica e inflamatória do doente é denominada de “Síndrome da Reconstituição Imune” (CDC, 2009; WHO, 2007)

Em relação a TB, o tratamento recomendado desde 1979 a 2008, pelo Ministério da Saúde era composto de esquema com múltiplos antimicobacterianos como a rifampicina, a isoniazida e a pirazinamida e em alguns esquemas terapêuticos o etambutol, por período de no mínimo seis meses. No entanto em 2009, uma mudança proposta para o tratamento da TB no Brasil foi à inclusão do etambutol na fase de ataque da terapia, já que o mesmo não fazia parte do esquema básico proposto anteriormente, restrito apenas a casos extrapulmonares, recidivas, abandono ou falência da terapêutica (Conde et al., 2009; Brasil, 2002).

Quanto as MNTs, não existe um consenso estabelecido para o tratamento, e a claritromicina é o medicamento de escolha, em associações para evitar possível resistência micobacteriana, na qual os aminoglicosídeos são a escolha. A terapêutica deve ser no mínimo de 12 a 18 meses, e são

requeridas culturas negativas por mais de 12 meses após o término da terapêutica. Em contra partida, nos soropositivos para o HIV, em uso de HAART, a terapêutica antimicobacteriana deverá ser interrompida com no mínimo seis meses da contagem de linfócitos TCD4⁺ acima 100 células/mm³. Convém salientar que o tratamento é variável de acordo com a espécie (São Paulo, 2005)

Um grande problema na terapêutica da co-infecção HIV/TB é a interação medicamentosa entre a rifampicina (principal medicamento utilizado no tratamento da TB), com a maioria dos inibidores de proteases e da transcriptase reversa não nucleosídeos. Essa interação ocorre em nível de biotransformação hepática com indução da citocromo CYP3A pela rifampicina e também pela diminuição da absorção intestinal, culminando em redução das concentrações sanguíneas do anti-retrovirais, e possível resistência viral (Brasil, 2008b; CDC, 2009; Jamal & Moherdai, 2007; Lemos, 2008). Nos casos da necessidade de utilização restrita dos inibidores de protease, a rifabutina é o medicamento de escolha e disponível para a composição do esquema básico para tuberculose, considerando-se seus efeitos de neutropenia e uveíte (CDC, 2009; Conde et al., 2009).

Outro agravante na co-infecção HIV/TB é o fenômeno da resistência micobacteriana que contribue para o aumento da mortalidade por ambas as doenças e persistência da fonte infecciosa seja na comunidade ou a nível hospitalar. No Brasil, a resistência a isoniazida e rifampicina e a mais uma droga, é denominada tuberculose multidroga resistente (MDR-TB), com alto risco para a falência terapêutica (Baliza et al., 2008; Jamal & Moherdai, 2007). Nesse contexto, o Brasil apresenta índices crescentes. Em 2005, foram

diagnosticados e notificados 373 casos, no ano seguinte, 399 casos, e um ano após foram registrados 832 casos (WHO, 2009b). Essa condição pode ser resultado de mutações genéticas, resistência natural em populações bacilares, resistência adquirida, pobre aderência terapêutica, co-infecção com HIV e lesões cavitárias (Baliza et al., 2008; BRASIL, 2002). Dessa forma, é de fundamental importância que todos os pacientes com tuberculose doença tenham o teste de sensibilidade micobacteriana para rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, e esse deve ser repetido para culturas de escarro controle por MT que permanecem positivas após três meses de terapia (Baliza et al., 2008; CDC, 2009).

6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO MYCOBACTERIUM SPP. NOS SOROPOSITIVOS PARA O HIV/AIDS

Em 2004 apenas 40% dos pacientes com tuberculose eram investigados para o HIV. Progressivo aumento é verificado nas estatísticas seguintes, que indicam que em 2007, esses índices aumentaram até em 80% (WHO, 2009b). No entanto, a pesquisa laboratorial do *Mycobacterium spp.* no paciente soropositivo para o HIV/AIDS, pelas metodologias fenotípicas de baciloscopia e cultura, freqüentemente apresenta sensibilidade reduzida pelo caráter paucibacilar (exceto nas cavitações) da doença nesses indivíduos (Banerjee, 2005; Brasil, 2002; CDC, 2009; Haldar et al., 2007; São Paulo, 2005, Sun et al., 2009).

No Sistema Público de Saúde no Brasil, o diagnóstico é geralmente fundamentado na baciloscopia, e a cultura e provas bioquímicas para o

Mycobacterium spp. é recomendada somente se há suspeita de TB pulmonar com baciloscopia negativa. Por outro lado, há disponibilidade do exame de cultura para os soropositivos para o HIV (Conde et al., 2009). Como vantagem, a baciloscopia caracteriza-se como técnica direta, não-invasiva, rápida e econômica, porém necessita de 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de amostra e ainda apresenta positividade variável para culturas positivas, visto que entre 45 a 80% das culturas para TB pulmonar por MT são negativas pela baciloscopia (Ani et al., 2009; Brasil, 2002; CDC, 2009; Gopinath & Singh, 2009).

A cultura, técnica “*gold standard*” para o diagnóstico da tuberculose e de suas formas extrapulmonares, apresenta maior sensibilidade, com detecção de 10 micobactérias por mL de escarro. Apesar de mais sensível que a baciloscopia, apresenta também resultado comprometido para amostras paucibacilares, e ainda requer de seis a oito semanas para definição do agente da doença (Ani et al., 2009; Bhattacharya et al., 2003; CDC, 2009; São Paulo, 2005; Cho et al., 2009, Sun et al., 2009). Adicionalmente, 5% das culturas podem sofrer contaminação durante o pré tratamento e a utilização de terapia antimicobacteriana pode levar a resultados falso negativos (Cho et al., 2009, Lima et al., 2005). Assim como, os resultados de culturas em amostras de sangue nos pacientes com sorologia positiva para o HIV/AIDS positivam em somente 40% nas formas pulmonares se os níveis de linfócitos TCD4⁺ forem inferiores a 200 células/mm³ (Bacha et al., 2004, Lima et al., 2005). O método automatizado, possibilita diminuição do tempo de detecção, e aumento da sensibilidade, mas não a nível desejável para amostras de líquido

encefalorraquidiano, pleural e urina (Assis et al., 2007; Gopinath & Singh, 2009; Noussair, et al., 2009).

Outras dificuldades para a definição do agente etiológico são as características clínicas e radiológicas da TB pulmonar nos soropositivos para o HIV/AIDS. A presença de sinais atípicos nesses indivíduos é comum e pode se alterar pelo do grau de imunossupressão. Assim, em muitas situações a terapêutica antimicobacteriana é iniciada empiricamente, com índices de até 60% de modificação após a definição do agente (Garcia et al., 2004; Kibiki et al., 2007). Contudo, em países em desenvolvimento o diagnóstico pode ser baseado exclusivamente em critérios clínicos, radiológicos e epidemiológicos (Brasil, 2002; Marchi et al., 2008).

Enquanto que as técnicas fenotípicas são a recomendação de escolha para tuberculose doença, a ferramenta para determinação da infecção latente por micobactérias é o Teste de Sensibilidade a Tuberculina. Apesar de sua recomendação em todo paciente HIV positivo sem diagnóstico de TB doença, a própria infecção pelo HIV, pode ser responsável por resultados falso negativos, relatados em aproximadamente 30% dos casos, dessa maneira resultados negativos nesses indivíduos requerem repetição anual, nas contagens de LTCD4⁺ abaixo de 200 células/mm³ (Brasil, 2002; Brasil, 2008b; CDC 2009; Conde et al., 2009; Jamal & Moherdai, 2007). Assim, a história de contato com tuberculose ou resultado anterior de PPD \geq 5 mm, indica a quimioprofilaxia, com isoniazida (9 meses), fármaco que reduz de 40 a 80% o risco dos infectados de desenvolverem a doença ativa (Brasil, 2002; Brasil, 2008b).

Nesse cenário de falhas nas técnicas fenotípicas para detecção de micobactérias, principalmente em amostras paucibacilares, assumem maior importância novas estratégias diagnósticas, entre elas, as técnicas moleculares. A promessa de melhor sensibilidade (uma cópia de DNA), especificidade e pronta detecção com resultados de 24 a 48 horas, em qualquer espécime clínico, são necessárias e possíveis (Battacharya, 2003; CDC, 2009; Castro et al., 2007; Cho et al., 2009; Marchi et al., 2008). Essas características possibilitam rápida confirmação da espécie e início do tratamento (Battacharya et al., 2003; CDC 2009; Sun et al., 2009).

Vários estudos em biologia molecular foram realizados nos últimos anos, no entanto, as orientações do CDC para utilização dos testes de amplificação do ácido nucléico para *M. tuberculosis* são vigentes a partir de 1996. Dessa forma, em junho de 2008, esse órgão e a Associação dos Laboratórios de Saúde Pública Americana recomendaram a realização dessa técnica em pelo menos um espécime respiratório de cada paciente com sinais e sintomas da tuberculose pulmonar. Contudo as rotinas fenotípicas de diagnóstico devem continuar sendo realizadas, e os resultados das três metodologias comparados. Em locais onde os testes moleculares são uma prática rotineira, os especialistas utilizam seus resultados para instituição da terapêutica antimicobacteriana em 20% a 50% dos casos de TB (CDC, 2009). No entanto, esses testes não devem ser utilizados para o monitoramento do tratamento e não substituem o exame de cultura para micobactérias (Conde et al., 2009; CDC, 2009). Por exemplo, em soropositivos para o HIV com MT e *M. avium*, a sensibilidade de detecção do DNA de micobactérias em amostras de sangue é

comparada a cultura, acrescentando para o rápido diagnóstico nesses pacientes (Restrepo et al., 2006).

Os ensaios moleculares baseados na reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são realizados com diferentes seqüências alvo, amostras clínicas e técnicas (Poroca et al., 2009, Restrepo et al., 2006) . Dentre os alvos destacam-se o *IS6110*, *hsp65*, região intergência 16S-23S DNAr (ITS), *rpoB*, 38kDa, 85B antígeno, 16SRNA, região *dna* (Bhattacharya et al; 2003, Negi, et al., 2007). Quanto ao método, o padrão para detecção molecular de *M. tuberculosis* é a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), técnica fundamentada na variabilidade em um local, que geralmente utiliza como alvo o Transposon *IS6110* (Malaghini et al., 2009). Convém salientar que os resultados dessas técnicas são variáveis quanto à sensibilidade e especificidade em diferentes laboratórios e dependem da amostra, sítio anatômico da doença, co-infecção com HIV e parâmetros técnicos (Ani et al., 2009; Pinto Júnior et al., 2008; Sun et al., 2009).

A acurácia dos testes moleculares é altamente heterogênea, e os inibidores e contaminação inter amostras estão entre os principais fatores, ainda o método é com frequência associado a elevados resultados falso positivos, mas por outro lado a baciloscopia positiva resulta em melhora da acurácia da PCR positiva em ausência de cultura, com sugestão de TB ativa (CDC, 2009; Haldar et al., 2007). Assim, em amostras com pesquisa de baciloscopia positiva, os métodos comerciais de biologia molecular apresentam elevadas sensibilidade (96%) e especificidade (85%) e em amostras BAAR negativas e culturas positivas sua capacidade de detecção é de 50 – 80%. Apesar de sua variável acurácia as técnicas moleculares são o método de

escolha quando há suspeita clínica e a baciloscopia é negativa (Battacharya et al., 2003; CDC, 2009; Conde et al., 2009)

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Finalmente, a ampla distribuição ambiental de micobactérias não-tuberculosas e seu papel na etiologia das micobacterioses em soropositivos para o HIV, além da própria epidemiologia da tuberculose, do HIV e da co-infecção, juntamente com as limitações fenotípicas e a inespecificidade de manifestações clínicas e radiológicas do *Mycobacterium spp.* nos soropositivos para o HIV, justificam estudos práticos e revisões acerca do tema. O diagnóstico precoce da doença permite o início rápido da terapia específica e, conseqüentemente, melhora o prognóstico do paciente. Isso justifica a incessante busca de metodologias diagnósticas mais rápidas e mais fidedignas. Porém, apesar do aumento na capacidade de detecção de micobactérias via método molecular, tal ferramenta necessita de padronização para implantação na rotina de diagnóstico. Desse modo, a análise de todas as ferramentas diagnósticas associadas à interpretação clínica, ainda são a escolha para definição da tuberculose doença.

8 REFERÊNCIAS

*AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. *Am J Respir Crit Care Med*; New York, v.175, p. 367-416.

2007. Disponível em:<http://ajrccm.atsjournals.org/cgi/reprint/175/4/367>

- *ANI, A.; OKPE, S.; AKAMBI, M.; EJELIONU, E.; YAKUBU, B.; OWOLODUN, O.; EKEH, P.; OCHE, A.; TYEM, D.; IDOKO, J. Comparison of a DNA based PCR method with conventional methods for the detection of *M. tuberculosis* in Jos, Nigeria. *J Infect Dev Ctries*, Itália, v. 3, n.6, p. 470-475, 2009.
- *ASSIS, N.C.S.; LOPES, M.L.; CARDOSO, N.C.; COSTA, M.M.; SOUZA, C.O.; LIMA K.V.B. Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Bras Patol Med Lab*, Rio de Janeiro, v.43, n.1, p.1-7, 2007
- *BACHA, H. A.; CIMERNAM, S.; SOUZA, S. A.; HADAD, D. J.; MENDES, C. M. F. Prevalence of Mycobacteremia in patients with AIDS and persistent fever. *Braz J Infect Dis*, Salvador, v. 8, n. 4, p. 290-295, 2004.
- *BALIZA, M.; BACH, A. H.; QUEIROZ, G. L.; MELO, I. C.; CARNERIO, M. M.; ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; SUFFYW, P.; RODRIGUES, L.; XIMENES, R.; LUCENA-SILVA, N. High frequency of resistance to the drugs isoniazid and rifampicina among tuberculosis cases in the City of Cabo de Santo Agostinho, an urban area in Northeastern Brazil, Uberaba, v.41, n.1, p.11-16, 2008.
- *BANERJEE, U. Progress in diagnosis of opportunistic infections in HIV/AIDS. *Indian J Med Res*, India, v.121, p.395-406, 2005.
- *BARNES, A. I.; ROJO, S.; MORETTO, H. Prevalencia de micobacteriosis y de tuberculosis en pacientes de un hospital de referencia de la provincial de Córdoba. *Rev Argen Microbiol*, Buenos Aires, v. 36, p.170-173, 2004.
- *BHATTACHARYA, B.; KARAK, K.; GHOSAL, A.G.; ROY, A.; DAS, S.; DANDAPAT, P.; KHETAWAT, D.; MONDAL, D.K.; BHATTACHARYA, S.; CHAKRABARTI, S. Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different

mycobacterial species. *Trop Med Int Health.* , Inglaterra, v. 8, n.2, p.150-157, 2003.

*BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_tuberculose.pdf

* _____. Agravos de Notificação - Sinan Net. Casos confirmados por Ano

Diagnóstico segundo Ano. Brasília: 2008 a. Available from:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>.

* _____.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos infectados pelo HIV: manual de bolso. 2008b. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS Brasília: Ministério da Saúde, 2008b. Disponível em:

<http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments>

* _____.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico.AIDST. CRT- DST/AIDS. CVE. ANO XXV. Nº 1. [citado 2009 Dez]. Disponível em: <http://www.crt.saude.sp.gov.br/content/dreruslith.mmp>

*CASTRO, C.M.; PUERTO, G.; GARCÍA, L.M.; et al. Identificación molecular de micobacterias *no* tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción, Colombia 1995-2005. *Biomedica*, Colombia, V. 27, n.3, p.439-46, 2007.

*CDC. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. Estados Unidos, v.

58, n.1, p. 7-10, 2009. Disponível em: F:\Updated Guidelines for the Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis.mht

*CHEADE, M. F. M.; IVO, M. L.; SIQUEIRA, P. H. G. S.; SÁ, R. G.; HONER, M. R. Characterization of tuberculosis among HIV/AIDS patients at a referral Center in Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Soc Bras de Med Trop*, Uberaba, v. 42, n.2, p. 119-125, 2009.

*CHO, C.H.; HAN, S.H.; CHIN, B.S et al. Diagnosis and species identification of Mycobacterial infections by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of sterile body fluids. *Korean J Intern Med*, Korea, v.42, n. 2, p. 135-138, 2009.

*CONDE, M.B.; MELO, F.A.F.; MARQUES, A. N.C.; CARDOSO, N. C.; PINHEIRO V.G.F.; DALCIN, P. T. R.; et al . III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J Bras Pneumol*, São Paulo, v. 35, n.10, p. 1018-1048, 2009. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132009001000011&lng=en)

[37132009001000011&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132009001000011&lng=en). doi: 10.1590/S1806-37132009001000011.

*DAVOUDI, S.; RASSOLINEGAD, M., YOUNESIAN, M.; HAJIABDOLBAGHI, M.; SOUDBAKHSH, A.; JAFARI, S.; EMADIKOUCHAK, H.; MEHRPOUYA, M.; LOFTI, H. CD4⁺ cell counts in patients with different clinical manifestations of tuberculosis. *Braz J of Infect Dis*, Salvador, v. 12, n. 6, p. 483-486, 2008.

*FERRAZ JC; MELLO FBS, ALBUQUERQUE MFPM, MONTENEGRO SML, ABATH FGC. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v. 39, n.11, p.1387-1397,2006.

*GARCIA, G. F.; MOURA, A. S.; FERREIRA, C, S.; RCOHA, M, O, C. Clinical and radiographic features of HIV-related pulmonary tuberculosis according to the level of immunosuppression. *Rev Soc Bras Med Trop*, Uberaba, v. 40, n.6, p.622-626, 2007.

- *GOPINATH, K. SINGH, S. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complexes and other Mycobacterial species directly from clinical specimens. *J Appl Microbiol*, England, v. 107, p. 425-435, 2009.
- *HALDAR, S.; CHAKRAVORTY, S.; BHALLA, M.; MAJUMDAR, S.; TYAGI, J. S. Simplified detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons. *J Med Microbiol*, Inglaterra, v. 56, p. 1356-1362, 2007.
- *JAMAL LF, MOHERDAUI F. Tuberculosis and HIV infection in Brazil: magnitude of the problem and strategies for control. *Rev Saude Publica*, São Paulo, v.41, (supl1), p.104-10, 2007.
- *KIBIKI, G. S.; MULDER, B.; VAN DER VEN, A. J. A. M.; BOEREE, M. J.; VAN DER ZANDEN, A.; DOLMANS, W. M. V. Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for M. tuberculosis in bronchoalveolar lavage fluid. *Trop Med Int Health*, England, v. 12, n.10, 1210-1217, 2007.
- *LANNOY, L.H.; ESCALANTE, J.J.C.; EVANGELISTA, M.S.N.; ROMERO, G.A.S. Tuberculosis incidence and risk factors among patients living with HIV/AIDS in public health service institutions in Brasilia, Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop*, Uberaba, v. 41, n.6, p.549-555, 2008.
- *LE MOS, A. C. M. Co-infecção tuberculose/HIV. *J Bras Pneumol*, São Paulo, v. 34, n.10, p. 753-755, 2008.
- *LIMA, D. M.; BOLLELA, V. R.; JACOMO, B. J.; MARTINEZ, R.; FONSECA, B. A. L. Identification of Mycobacterium species in contaminated cultures of polymerase chain reaction. *Estados Unidos da América*, v. 127, n.4, p. 1283-1288, 2005.
- *LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, São Paulo, v.51, n.5, p.247-253, 2009.

*MALAGHINI, M.; BROCKLET, S. R.; BURGER, M.; KRITSKI, A., THOMAZ-SOCCOL, V. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the state of Parana in southern Brazil. *Tuberculosis*, Japão, v. 89, p.101-105, 2009.

*MARCHI AM, JUTTEL ID, KAWACUBO EM, DALMARCO EM, BLATT SL, CORDOVA, CMM. Evaluation of methods for detection and identification of *Mycobacterium* specie in patients suspected of having pulmonary tuberculosis. *Braz J Microbiol* , Salvador, v. 39, n. 4, p.29-32, 2008.

*MURCIA, M, I.; LÉON, C. I.; HOZ, F.; SARAIVIA, J. Asociación micobacterias-VIH-SIDA em pacientes atendidos em um Hospital Universitário em Bogotá, Colômbia. *Revista Salud Publica*, Bogotá, v. 9, n. 1, p. 97-105, 2007.

*NAKATANI, S. M.; MESSIAS-REASON, L. J. T.; BURGER, M.; CUNHA, C. A. Prevalence of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in blood cultures of Brazilian AIDS patients after introduction of highly active retroviral therapy. *Braz J Infect Dis*, Salvador, v. 9, n. 6, p. 459-463, 2005.

*NEGI, S.S.; ANAND, R.; PASHA, S.T.; GUPTA, S.; BASIR, S.F.; KHARE, S.; LAL, S. Diagnostic potential of IS6110, 38 KDA, 65 KDA and 85b sequence basead polymerase chain reaction in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Indian J Med Microbiol*, Índia, v. 25, n.1, p. 43-49, 2007.

*NOUSSAIR, L.; BERT, F.; GUIBOUT-LEFLO, V.; GAYET, N.; CHANOINE-NICOLAS, M. H. Early diagnosis of extrapulmonary tuberculosis bu a new procedure combining broth culture and PCR. *J Clin Microbiol*, Estados Unidos da América, v. 47, n. 5, p. 1452-1457, 2009.

*NUNES, E.A.; DE CAPITANI, E.M.; COELHO, E.; PANUNTO, A.C.; JOAQUIM, A.O.; RAMOS,M.C. Doença pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não-tuberculosas entre *pacientes* recém-

diagnosticados como HIV positivos em Moçambique, África. *J Bras Pneumol*, Brasília, v.34, n.10, p. 822-828, 2008.

*ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- PAHO. Tuberculosis in the Americas: Regional Report 2008. Disponível em:

[http://new.paho.org/hq/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=1344].

* _____. PAHO. Situación de la salud en las Américas. Indicadores Básicos 2009. Disponível em:

[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=doc_download.

*PEDRO, H. S.P.; PEREIRA, M. I. F.; GOLONI, M. R. A.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996-2005. *J Bras Pneumol*, São Paulo, v. 34, n. 11, p. 950-955, 2008.

*PIERSIMONI C, SCARPARO C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis*, v.8, n.5, p.323-334, 2008.

*RESTREPO BI, GOMEZ DI, SHIPLEY GL, MCCORMICK JB, FISHER-HOCH SP. Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. *J Microbiol Methods*, Netherlands v. 67, n.2, p. 220-229, 2006.

*PINTO, J. H.; BICA, C. G.; PALACI, M. DIETZE R.; BASSO, L. A.; SANTOS D. S. Detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas por reação em cadeia da polimerase utilizando primers baseados na região intergênica *plcB-plcC*. *J Bras Pneumol*, São Paulo, v.4, n.4, p.437-442, 2007.

*POROCA, D. R.; LIMA, A. S.; LIMA, J. F. A.; CRUZ, H. L. A.; MONTENEGRO, R. A.; MELO, F. L.; SCHINDLER, H. S.; MONTENEGRO, L. M. L. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. *Rev Soc Bras Med Trop*. [serial on the Internet], Uberaba, v. 42, n.6, p. 716-722, 2009 .

*SAAD, M.H.F.; TELLES, M.A.; PORFIRIO, F.; FERRAZOLI, L.; FONSECA, L. S.; JHONSON JR, W.; RILEY, L.W . Multiple isolates from Aids Patients:

Aspect of an analysis by a genotypic marker and antimicrobial susceptibilities variations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.95, n.5, p.729-732, 2000.

*SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Tuberculose. Coordenadoria de Controle de Doenças. Micobacterioses. Recomendações para o diagnóstico e tratamento (Manuscrito sujeito à revisão) São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2005. Disponível em:

ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/MNT_Final_9-12-05a.pdf

* _____. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Controle da Tuberculose CVE-SES/SP. Tb em números. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2009. Disponível em : http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/TB/tb_num/tb_cn08.htm

*SUN, J-R,; PERNG, C-L.; LU, J-J. Detecting Mycobacterium tuberculosis in Bactec MGIT 960 cultures by Inhouse IS6110-basead PCR assay in routine clinical practice. *J Formos Med Assoc*, China, v.108, n.2, p.119-125, 2009.

*UEKI SYM, MARTINS MC, TELLES MAS et al . Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med*, Rio de Janeiro, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2005.

*UNITED STATES OF AMERICA. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services, p.1-161. 2009. Disponível em:

<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.

*VENDRAMINI, S.H.F. ; GAZETTA, C.E.; CHIARAVALOTTI N.F.; CURY MR, MEIRELLES EB, KUYUMJIAN FG. et al . Tuberculose em município de porte médio do Sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade, de 1985 a 2003. *J Bras Pneumol*, Brasília, v. 31, n. 3, 237-243, 2005.

*WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents. Recommendations for HIV- prevalent and resource-constrained settings. Geneva: WHO; 2007. Disponível em:
http://www.who.int/tb/publications/2006/tbhiv_recommendations.pdf

* _____. Global Tuberculosis Control – epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO; 2009a. Report 2009: Chapter 1: Epidemiology. Disponível em:
www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/tbu_9.pdf

* _____. Report 2009. Global tuberculosis control. Geneva: WHO, 2009b. Disponível em:
[http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/bra.pdf].

ARTIGO III

Avaliação da técnica de Nested-PCR para detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras pulmonares e extrapulmonares de pacientes suspeitos de tuberculose.

Furini, Adriana Antônia da Cruz ^{1,2}; Pedro, Heloisa da Silveira Paro ³; Rodrigues, Jean Francisco Rodrigues^{1,2}, Oliveira, Marcell Sant'anna Camacho¹, Montenegro, Lilian Maria Lapa ⁴; Machado, Ricardo Luiz Dantas¹; Franco ,Célia⁵; Schindler, Haiana Charifker ⁴; Rossit, Andrea Regina Baptista ^{1,6}.

1. FAMERP; Centro de Investigação de Microrganismos /Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; Av Brigadeiro Faria Lima, 5416 São José do Rio Preto.
2. UNIRP; Centro Universitário de Rio Preto; Rua Ivete Gabriel Atique, 45 São Jose do Rio Preto
3. IAL; Setor de Micobactérias/Instituto Adolfo Lutz; Rua Alberto Sufredini Bertoni, 2325 São José do Rio Preto.
4. CPqAM/Fio Cruz; Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães; Av Professor Moraes Rego s/n Recife.
5. FUNFARME; DDIP/Fundação Faculdade Regional de Medicina; Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 São José do Rio Preto.
6. UFF; Universidade Federal Fluminense; Rua Prof. Hernani Pires de Melo, 101 Niterói.

Autor responsável: Andréa Regina Baptista Rossit

Rua: Prof. Hernani Pires de Melo, 101

Bairro: São Domingos

CEP: 24210-130

Cidade: Niterói – Rio de Janeiro, Brazil

Email: andrea-regina@vm.uff.br; cruzdri@ig.com.br

Revisores sugeridos:

Clarice QueicoFujimura Leite

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Ciências Biológicas.

Rodovia Araraquara - Jaú , Km 01 . Lab. microbiologia , sala 417

Cep:14801-902 Cidade: Araraquara Estado: São Paulo País: Brasil - Caixa-Postal: 502

Telefone: (16) 33016953 Fax: (16) 33016940

URL da Homepage: <http://www.fcfar.unesp.br>

Antonio Ruffino Netto

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Medicina Social.

Av. Bandeirantes, 3900 Bairro: Monte Alegre

Cep: 14049-900 Cidade: Ribeirao Preto, Estado: São Paulo País: Brasil

Telefone: (16) 6023070 Fax: (16) 6331386

Resumo

O diagnóstico das formas paucibacilares da tuberculose (TB), que acomete principalmente imunocomprometidos, transplantados e das formas extrapulmonares é limitado pelos métodos convencionais. . A reação da polymerase em cadeia (PCR) e suas variações, tais como a Nested-PCR (NPCR), tem sido descritas como técnicas promissoras para o rápido diagnóstico da tuberculose. Avaliação de um protocolo de NPCR para detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em sítios anatômicos pulmonares e extrapulmonares de indivíduos com suspeita clínica de TB. Foram incluídas, prospectivamente, 24 amostras de sítios pulmonares e 85 extrapulmonares, coletadas a partir de 49 indivíduos soropositivos para o HIV e 28 soronegativos e submetidas ao método gold standard e a NPCR tendo como alvo o transposon *IS6110*. A tuberculose foi diagnosticada em 11 pacientes (14,3%), com 54,5% de formas extrapulmonares e 45,5% pulmonares. A NPCR foi positiva em todos, enquanto a cultura em apenas cinco deles. A positividade da baciloscopia entre os espécimes clínicos foi de 9.2%. A cultura permitiu o isolamento de sete cepas de *M. tuberculosis* e duas do *Complexo M. avium* (8,25%). A positividade molecular foi descrita em 23,85% das amostras. O desempenho da NPCR frente a cultura, para amostras pulmonares (n=22) e extrapulmonares (n=83) foi similar (100% de sensibilidade e aproximadamente 83% de especificidade). A positividade pela NPCR foi significativamente maior que o isolamento por cultura entre as amostras extrapulmonares (p=0.0042). Os resultados obtidos sugerem a realização de estudos mais amplos que corroborem o potencial da NPCR-IS6110 para a detecção do genoma micobacteriano na TB extrapulmonar, em especial entre imunocomprometidos.

Palavras Chave: Diagnóstico molecular, *Mycobacterium tuberculosis*, Nested-PCR, Paucibacilar, Transposon IS6110

INTRODUÇÃO

Apesar de manifestações clínicas milenares, tratamentos eficazes e da profilaxia pela vacina de Calmette-Guérin (BCG), a tuberculose (TB) mantém-se nos dias atuais como um sério problema de saúde pública [1-3]. A epidemia da AIDS também contribui para a gravidade da TB; somente no ano de 2007, 456.000 mortes ocorreram entre os 1.370.000 pacientes co-infectados [1,3]. De fato, metade dos indivíduos soropositivos para o HIV desenvolve infecções micobacterianas e a TB é responsável por um terço das mortes entre os doentes de AIDS [4,5]. Nas Américas, são representativos os custos para o sistema público de saúde, bem como o número de mortes por TB [6]. Atualmente, o Brasil ocupa a 14ª posição entre os países que concentram 75% dos casos de TB [1]. Somente no ano de 2008 foram 81.660 notificações [7], das quais aproximadamente um quarto ocorreu no Estado de São Paulo, com 26,87% o percentual de baciloscopias negativas ou não realizadas [1,8].

A doença tuberculosa, pulmonar e extrapulmonar, é ocasionada principalmente pelo *M. tuberculosis* [9,10]. Nos soropositivos para o HIV, metade dos afetados desenvolve formas extrapulmonares [11, 12] e a imunossupressão é fator adicional a rápida progressão para doença ativa, além de maior risco de reativação [4,

5, 13]. Os portadores de doença reumática crônica e os submetidos a transplante de órgãos também representam grupos mais susceptíveis à manifestação da TB [14, 15]. Todos esses pacientes tem em comum a manifestação predominante da doença em sua forma paucibacilar, que ultimamente assume maior importância epidemiológica e constituiu, ainda, um desafio diagnóstico [3, 11, 16-19].

O diagnóstico laboratorial clássico da tuberculose é realizado por técnicas fenotípicas e bioquímicas [3]. A baciloscopia apesar de rápida e econômica apresenta baixa sensibilidade e especificidade; já a cultura, embora mais sensível, requer de 4 a 8 semanas para o estabelecimento do resultado [9, 11, 17, 19]. Nesse cenário, convém salientar que em países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, o diagnóstico laboratorial muitas vezes é fundamentado apenas na baciloscopia, na radiografia sugestiva e na sintomatologia, ficando a cultura e as provas bioquímicas para o *Mycobacterium* spp. realizadas apenas frente a um resultado de baciloscopia negativa em paciente sintomático respiratório [9, 13]. No entanto, mesmo a realização da cultura aliada ao diagnóstico clínico -epidemiológico, podem ser dificultados entre portadores das formas paucibacilares da TB, já que a cultura é frequentemente negativa e a clínica, por sua vez, inespecífica [9,10,12,17,18]. De fato, na TB extrapulmonar, a positividade da cultura entre os doentes tem variação ampla (12 a 80%) e depende das amostras e tecidos biológicos pesquisados, que podem ter uma distribuição não uniforme da micobactéria [11, 12, 20]. Adicionalmente, a suspeita da doença em sítios de difícil requer o uso de procedimentos invasivos, como no caso de amostras pleurais, de biópsias renais e hepáticas e de punção do líquido [11, 20, 21].

Tais limitações estimularam o uso das ferramentas moleculares, que potencializaram a sensibilidade, a especificidade e a rapidez na detecção de micobactérias a partir de qualquer espécime clínico, incluindo aqueles paucibacilares, independentemente do status do HIV [10, 16, 17, 19, 20]. Desta maneira, os testes moleculares associados a manifestações clínicas sugestivas, podem auxiliar no estabelecimento da terapêutica antimicobacteriana, principalmente frente ao resultado negativo por baciloscopia. Tal recurso pode contribuir ainda para a futura diminuição da prescrição empírica, atualmente empregada em quase 27% dos casos suspeitos de tuberculose pulmonar e, por outro lado, representa medida importante para o controle da doença [10-12, 16-18]. Assim, vários autores publicaram ensaios moleculares para o diagnóstico da TB em diferentes: grupos de pacientes, amostras clínicas e protocolos, alvos gênicos micobacterianos e oligonucleotídeos iniciadores com alta variação de sensibilidade (20 a 100%) e com especificidade de até 98% [11, 16, 18-20, 22].

Hoje, encontra-se em andamento no País um esforço cooperativo na direção de padronização de uma técnica molecular para detecção de micobactérias junto aos setores diagnósticos do Sistema Único de Saúde, entre laboratórios de pesquisa situados em diferentes regiões, das quais faz parte o Laboratório de Imunoepidemiologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/PERNAMBUCO). A cidade de São José do Rio Preto, localizada na região Noroeste do Estado de São Paulo, participa desta investigação via Centro de Investigação de Microrganismos da FAMERP (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto), já que foi considerada prioritária pelo Programa de Controle da TB [3], devido à alta taxa de pacientes com tuberculose e exame sorológico positivo para o HIV-1, alcançando índices de 35 a 51% no período de 1998 a 2005 [23]. A proposta deste estudo foi avaliar um protocolo de Nested PCR (NPCR) para detecção do complexo *M. tuberculosis* em

sítios anatômicos pulmonares e extrapulmonares de indivíduos com suspeita clínica de TB. Ademais, descreve características clínico-epidemiológicas desses pacientes.

MATERIAL E MÉTODO

1- Pacientes envolvidos e coleta dos espécimes clínicos

Estudo do tipo prospectivo e descritivo, conduzido de fevereiro a dezembro de 2009, conduzido pelo Centro de Investigação de Microrganismos (CIM), São José do Rio Preto, Sudete do Brazil. A coleta de amostras e avaliação clínica foi realizada por médicos especialistas do Hospital de Base (HB), uma instituição de referência para o diagnóstico e tratamento de tuberculose, um centro terciário que atende a população da região Noroeste paulista de São Paulo. Dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos prontuários médico de acordo como o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP São José do Rio Preto (CEP-FAMERP, 064/2009): moradia, idade, terapia antiretroviral, carga viral, condição imune, utilização de tabaco, drogas ilícitas, etilismo.

Os critérios de inclusão dos pacientes envolvidos no estudo são apresentados na Tabela 1. Todos os pacientes incluídos no estudo tinham acima de 18 anos de idade e tinham sintomas e sinais clínicos ou história médica (imunossupressão, doença auto-imune, transplante de órgãos, soropositivo para o HIV) sugestivos de tuberculose pulmonar ou extrapulmonar. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram obtidas amostras clínicas de 77 indivíduos, 49 soropositivos para o HIV-1 e 28 soronegativos, coletadas durante a internação hospitalar.

A escolha dos fluidos biológicos e tecidos foi baseada no Manual Nacional de Vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias [24]. Cento e nove espécimes clínicos foram incluídos no estudo, assim distribuídos: 24 espécimes pulmonares (escarro, lavado brônquico e lavado gástrico) e 85 extrapulmonares (sangue, líquido, aspirado de linfonodo, urina, líquido pleural, secreção ganglionar, fragmento de pleura, fragmento hepático, líquido ascítico aspirado/biópsia de medula óssea). A soropositividade para o HIV foi determinado pela presença de anticorpos anti-HIV, medidos pela técnica de ELISA e confirmados pelo Western blot. Carga viral (VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay bDNA, Siemens, Bayswater Victoria, Australia) e a condição imune (TriTEST CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP, Becton Dickinson, CA) foi investigada durante a internação hospitalar.

O diagnóstico de TB foi realizado por um dos médicos da equipe deste estudo e os indivíduos incluídos neste estudo foram considerados doentes quando um ou mais dos seguintes critérios foram observados: evidência clínica e/ou radiológica de TB, história de contato com adulto portador de tuberculose confirmada laboratorialmente e isolamento do *M. tuberculosis* em amostra clínica, por meio de exame direto ou cultura e, finalmente, por melhora clínica evidente após tratamento antimicrobacteriano específico.

2- Análise Laboratorial

2.1 Baciloscopia, Cultura, Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos para *M. tuberculosis*

Após a obtenção de uma alíquota das amostras para realização da técnica molecular no CIM, o restante das mesmas foi imediatamente enviado para Instituto Adolfo Lutz-São José do Rio Preto, Laboratório de Micobactérias da Seção de Biologia Médica para o diagnóstico fenotípico [25], segundo recomendações do Manual de Controle da Tuberculose para transporte e metodologias.

A baciloscopia direta foi realizada pela técnica de Ziehl-Neelsen para a pesquisa do Bacilo Álcool Ácido Resistente [25]. Paralela à baciloscopia foi efetuada a cultura para todas as amostras coletadas e posterior identificação para amostras positivas pelo método molecular [26,27]. Utilizou-se o protocolo de neutralização e descontaminação com N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (NALC-NaOH) [25]. A seguir procedeu-se a cultura em sistema automatizado em frascos contendo o meio de cultura BacT/ALERT MP, previamente suplementado com MB/BacT Antibiotic Supplement (BioMérieux, França) [26,27]. Nos casos de hemocultura, o sangue foi diretamente inoculado em frascos BacT/ALERT MB, próprios para esse espécime clínico. Uma vez inoculados, os frascos foram incubados em estufa microbiológica, também do mesmo sistema, e continuamente monitorados quanto à presença de micobactérias. A positividade resultou da presença de dióxido de carbono (CO₂) no meio de cultura, via metabolismo bacteriano, detectada por sensor colorimétrico sensível à mudança de cor. O tempo máximo de permanência dos frascos no aparelho foi de 42 dias ou então até que houvesse sinal de resultado positivo, segundo análise por “software” associado ao sensor colorimétrico. A partir de todas as culturas positivas, foi feita pesquisa de BAAR e, depois, o subcultivo em meio de Ogawa –Kudoh em estufa bacteriológica a 37 °C para a obtenção das colônias e posterior identificação [25]. As culturas positivas foram triadas quanto às características fenotípicas em MT/MNT e encaminhadas ao IAL-São Paulo para identificação por testes bioquímicos e no caso das MNT também por biologia molecular para confirmação da espécie, pelo método de PCR/RFLP, com amplificação de um fragmento de 441pb do gene *hsp65* e análise dos perfis de restrição das enzimas *BstEII* e *HaeIII* [27].

As micobactérias identificadas como *M. tuberculosis* foram testadas para sensibilidade a rifampicina, isoniazida, etambutol, estreptomina e pirazinamida.

2.2- Processamento da amostras clínicas e extração do DNA

As análises moleculares foram realizadas a partir dos espécimes clínicos. Para a amostra sanguínea uma alíquota foi coletada em tubos a vácuo com EDTA e acondicionado a 4° C. Após foi realizada a diluição de 4mL em volume igual de PBS (pH = 7,2) em tubo Falcon® de 15mL, com adição de 3mL de Ficoll Histopaque® (Sigma) gelado. A seguir o conteúdo do tubo foi centrifugado por 30 minutos a 200 rpm, com separação do plasma (1ª camada) e o anel de células brancas [17, 28, 29]. A extração de DNA das outras amostras biológicas foi realizada por meio do protocolo de Rossetti et al. 1997 [30], com modificações descritas por Lima et al. 2009 [18]. Uma alíquota de 500 µL da amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 min e submetida a três lavagens com tampão Tris-EDTA (TE). O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de TE e aquecido em termobloco a 100°C por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 5 µL de resina (Sephaglas BandPrep Kit; Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e, ao volume final obtido, foi acrescentado o dobro de uma solução

de iodeto de sódio (0,9 g/mL). Em seguida, o tubo foi agitado por 5 min e incubado à temperatura ambiente por mais 5 min. Os tubos foram centrifugados por 1 min, após o descarte do sobrenadante

foi adicionado 200 µL de etanol gelado a 70%, ao sedimento e em seguida nova agitação e centrifugação por 1 min. O sedimento foi mantido à temperatura ambiente durante 60 min para secagem completa e ressuspenso com 40 µL de TE 1X. Após o tubo foi incubado em banho-maria a 50°C por 10 min. Posteriormente, o tubo foi centrifugado por 1 min e o sobrenadante transferido para outro tubo e estocado a -20°C até o processamento da amostra. Um controle negativo usando TE foi incluído durante a extração do DNA e manipulado como amostra biológica [18, 30].

2.3 NPCR

Para amplificação do elemento de inserção *IS6110* (GenBank NP_215310.1), foram realizadas duas reações separadas (lima 2009). Na 1ª reação: 100ng DNA genômico purificado foi amplificado numa reação de 50 µL contendo: 1X de tampão (10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,01% gelatina (W/V), 50mM MgCl₂, 10 pm/µL de cada oligonucleotídeo (TJ3 5'-ATC CCC TAT CCG TAT GGT G-3') e TJ5 5'-CCG CAA AGT GTG GCT AAC-3'), 0.2µM dNTP e 5U de Taq DNA polimerase . Trinta ciclos foram realizados após uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos num termociclador (DNA MasterCycler; Eppendorf, Madison, WI, USA) . Cada ciclo consistia de uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 min; 57°C por 1 min e 72°C, por 1 min, com uma extensão de 72°C por 5 minutos. Uma etapa adicional à primeira reação foi realizada utilizando 10 µL do produto de PCR com as mesmas condições acima descritas usando outros pares de oligonucleotídeos (*STAN3* 5'-GTC GAG TAC GCC TTC TTG TT-3' e *OLI 5* 5'-AAC GGC TGA TGA CCA AAC-3') e outra temperatura de anelamento (60°C). Os oligonucleotídeos das duas reações, dNTP e Taq DNA polimerase foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brasil).

Para cada amplificação foi incluído um controle positivo contendo DNA extraído de cepa de referência de *M. tuberculosis* H37Rv, e dois controles negativos , uma da extração e outro da reação com Milli-Q water. Após coloração com brometo de etídio, os produtos amplificados na segunda reação de 365 pb foram analisados em gel de agarose a 2,0% e visualizados em um transluminador com luz UV (Fisher-biotech, FDBLT-88, Austrália) e fotografadas com um revelador Kodak (EDAS 290, Estados Unidos da América). O marcador de peso molecular de 100 pares de base utilizado foi o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil).

3- Análise Estatística

O programa BioEstat versão 5.0 [31] foi utilizado para análise estatística com a positiva baciloscopia e ou cultura consideradas como *gold standard*. O valor de p menor que 0.05 foi considerado estatisticamente signigicante.

RESULTADOS

Dos setenta e sete pacientes incluídos no estudo, 49 (63,5%) eram soropositivos para o HIV-1 e 28 (36,5%) soronegativos. A faixa etária variou de dezoito a oitenta e sete anos de idade (média 43,1 e \pm 3,88). A maioria era do sexo masculino (63,7%) e de etnia caucasóide (70,2%). Residem na zona urbana 90,9% dos indivíduos, enquanto 40,2% referiram tempo de instrução formal inferior a quatro anos. Treze deles (16,8%) foram considerados etilistas e pouco mais de um quarto (n= 22) fazia uso do tabaco. Dentre os 28 soronegativos para o HIV-1, 18 encontrava-se sob terapêutica imunossupressora, por transplante ou doença auto-imune. As comorbidades mais freqüentes nos soropositivos para o HIV foram a candidíase oro-esofágica (n= 16), a hepatite C (n=16) e a neurotoxoplasmose (n=15) e nos soronegativos, o Lúpus Eritematoso Sistêmico (n=7).

Foram obtidos 109 espécimes clínicos a partir dos 77 indivíduos pesquisados, de acordo com a suspeita clínica. A Tabela 2 mostra os espécimes clínicos coletados segundo os resultados da baciloscopia, cultura e NPCR com percentuais de positividade de 9,2% (n=10; up to one cross), de 8,25% (n=9) e 23,85% (n=26), respectivamente. Dentre os últimos, em aproximadamente 65% dos espécimes clínicos não foi possível a obtenção de isolados em cultura. Quando comparados os métodos de cultura versus NPCR para as amostras extrapulmonares a positividade pelo método molecular foi significativamente maior (p = 0.0042; Teste Exato de Fischer) o que se repetiu quando consideradas apenas as sanguíneas (p = 0.0447; Teste Exato de Fischer). O mesmo resultado não foi obtido quando avaliadas apenas as amostras pulmonares (p = 0.4936; Teste Exato de Fischer).

Quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade, a comparação dos resultados obtidos pela baciloscopia versus NPCR revelaram que o método molecular obteve sensibilidade de 80% e especificidade de 87% (VPP=38%; VPN=97%). A comparação do desempenho da NPCR frente a cultura considerando somente as amostras pulmonares (n=22), mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 83,3% (VPP=57%; VPN=100%). No entanto, para as 81 amostras extrapulmonares investigadas (exceto duas amostras sanguíneas com *M. avium*) essa mesma comparação mostrou menor sensibilidade (100%) e especificidade (82%) da metodologia molecular (VPP=17%;VPN=100%). Quatro culturas contaminadas foram excluídas dessas comparações.

Nenhum isolamento a partir dos espécimes clínicos provenientes dos indivíduos com sorologia negativa para o HIV-1 pode ser verificado, no entanto *M. tuberculosis* foi obtido a partir de diferentes espécimes clínicos (liquor, sangue e escarro) de cinco pacientes soropositivos para o HIV-1. *M. avium* também foi isolado para outros dois indivíduos do mesmo grupo, a partir do sangue. A média de LTCD4⁺ e carga viral para o grupo de pacientes soropositivos para o HIV-1 com resultados negativos por baciloscopia, cultura e NPCR (34/49) foi de $189 \pm 182,21$ células/mm³ e $96,99 \pm 70,99$ cópias/mL, respectivamente. Em contrapartida, no grupo de pacientes soropositivos para o HIV com resultados positivos por pelo menos uma dessas metodologias (15/49), essas médias foram de $86 \pm 67,25$ células/mm³ e $167,83 \pm 191,24$ cópias/mL, respectivamente

Foi estabelecido o diagnóstico de tuberculose em 11 pacientes (14,3%), com 54,5% da forma extrapulmonar e 45,5% de forma pulmonar. Quatro desses pacientes eram soronegativos para o HIV-1

(4/28), com dois casos pulmonares e outros dois com a forma pleural. A positividade da NPCR entre os mesmos foi determinada por apenas um espécime clínico (sangue ou líquido pleural), cujos resultados mostraram-se negativos por cultura. Metade desses pacientes evoluiu para óbito, não atribuída a TB.

Entre os pacientes soropositivos para o HIV-1 (n=49), sete diagnósticos finais de tuberculose (14.3%) foram estabelecidos. Três deles com tuberculose pulmonar, e exames de baciloscopia e NPCR positivos para todas as amostras (1 a 5, por paciente), com apenas uma cultura negativa a partir do escarro. Os demais doentes (4/7) apresentaram formas extrapulmonares: dois deles a forma meníngea (cultura e NPCR positivas no líquido);

um outro a manifestação pleural (NPCR positiva somente) e, por fim, uma TB miliar com positividade dependente da amostra colhida. Para esse último, o sangue e o escarro foram positivos por cultura e NPCR, no entanto resultados contraditórios foram obtidos para o líquido (cultura positiva e NPCR negativo) e para o aspirado de linfonodo (cultura contaminada e NPCR positiva). O desfecho deste paciente foi o óbito, assim como o de dois outros com formas pulmonares da doença.

Em 7.8% patients (6/77) com resultados positivos pela NPCR result, o médico não considerou diagnóstico de tuberculose. Por outro lado, todos os pacientes com culturas positivas para o *M. tuberculosis* (n= 9) receberam o tratamento antimicobacteriano preconizado pelo Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil [3]. Todas essas cepas foram sensíveis aos antimicobacterianos testados.

Discussão

O controle da tuberculose baseia-se no diagnóstico clínico-laboratorial precoce e tratamento adequado. No entanto, uma metodologia de diagnóstico laboratorial efetiva ainda não foi alcançada, principalmente para o doente denominado paucibacilar, no qual a sensibilidade dos métodos considerados *gold standard* é diminuída [9,12,17,19,32]. A técnica de NPCR, utilizando como alvo o *transposon* IS6110, vem oferecendo melhores resultados entre as formas paucibacilares conforme estudos de Garcia et al. no México em 2009 [20], de Assis et al. em 2007 [33] e Lima et al. em 2009 [18] no Brasil e por Liu et al. 2007 [21] em Taiwan com respectivamente 86%, 98%, 26% e 43% de sensibilidade e 79%, 15%, 92% e 95% de especificidade. Assim, o presente estudo busca contribuir para a avaliação dessa metodologia para investigação laboratorial rápida da tuberculose entre indivíduos paucibacilares.

O perfil sócio-demográfico e clínico da população deste estudo acompanha a tendência da tuberculose e da infecção pelo HIV-1 no Estado de São Paulo [5,23,34,35], onde a população masculina, caucasóide, de baixa condição sócio-econômica e escolaridade, com faixa etária entre 25 a 44 anos é acometida [5, 23, 36]. Quanto às co-morbidades mais frequentes nos soropositivos para o HIV-1, essas repetem o referido anteriormente no Brasil e nos EUA [34, 35]. Conforme esperado, em relação aos soronegativos para o HIV-1, o LES foi a co-morbidade mais frequente (7/28), dados os critérios de inclusão adotados. De fato, estudos anteriores descreveram a presença da co-morbidade LES em portadores de TB na Índia onde a incidência foi de 2.450/100.000 e na Turquia com 150/100.000 [37].

Ademais, a nefrite lúpica é clinicamente similar à TB renal o que chama a atenção para o uso racional de imunossupressores bem como para a investigação da TB latente entre esses pacientes [15].

Os resultados discordantes entre o método molecular e a baciloscopia (17 amostras – Tabela 2), aqui encontrados, não surpreendem já que resultados negativos pela baciloscopia (n=99), com no máximo uma cruz (n=10), podem ser decorrentes da baixa sensibilidade da técnica associada à natureza paucibacilar das amostras ou mesmo à ausência da infecção por BAAR [11, 12, 17-19]. No presente estudo, sete pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de TB mostraram baciloscopia negativa e NPCR positivo. No Brasil, de acordo com as Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (2009), ainda não existem manuais que padronizem a definição de caso de tuberculose pelo resultado molecular positivo. Na prática, seu uso fica restrito a alguns centros de referência e pesquisa, para que tais resultados possam ser utilizados em situações que exigem rápido diagnóstico [13].

A comparação da detecção do complexo *M. tuberculosis* por NPCR frente à cultura mostrou, para as amostras pulmonares, parâmetros ideais de sensibilidade (100%), porém com especificidade (83,3%) satisfatória. De fato, o desempenho da PCR mostra-se promissor em amostras de escarro de doentes adultos [9,18]. Estudos prévios, nesse tipo de amostra, com o alvo IS6110 [10, 22, 33], reportaram menor sensibilidade (88% a 98%) e especificidade variando entre 15% a 100%. Essa divergência pode estar associada às diferentes seqüências-alvo utilizadas, volume e tipo de amostras, além dos diferentes protocolos de biologia molecular empregados em laboratórios distintos [10,18,19,22]. Dessa maneira, a correlação dos resultados com a clínica do paciente é fundamental para o diagnóstico de TB, e pode-se estabelecer a doença a partir de culturas negativas, após a prova terapêutica [22].

Para às amostras extrapulmonares, mesma sensibilidade foi obtida e a especificidade foi semelhante (82,05%), com maior poder de positividade pelo método molecular ($p = 0.0042$), descrita também como significativa no estudo de Noussair et al. 2009 [12]. Quanto à sensibilidade, índices variáveis pela metodologia molecular foram descritos neste mesmo tipo de amostra na França [12], na Índia [11] e no Chile [10], nos quais os valores descritos foram de 86,6% e 90% e 50%, respectivamente. No entanto, tais resultados devem ser interpretados com cautela já que a cultura não se mostra *gold standard* para validar a eficácia de um novo procedimento diagnóstico no caso das amostras extrapulmonares [12], justamente por sua natureza paucibacilar, com positividades que variam entre 12 a 80% [10-12,20]. Assim, a variação na sensibilidade é um dos obstáculos para o desenvolvimento completo e padronização desta técnica em laboratórios de referência. Ainda, a especificidade e VPN superiores a 82%, e 97% respectivamente, permitem afastar a ocorrência de doença em casos de resultados negativos no teste molecular.

A bacteremia por *M. tuberculosis*, foi descrita de modo mais significativo apenas após o advento da infecção pelo HIV [38], com relatos que mostram 26-42% de frequência de isolamento desse agente na TB pulmonar e de até 60% nas apresentações extrapulmonares entre os portadores desse vírus [29]. Para esse mesmo grupo, as prevalências detectadas em estudos no Brasil, por meio da cultura, variaram de 15 a 25,6% [38,39] tendo sido os maiores valores obtidos na era pré-HAART. Gopinath et al. 2009 [17], Rebollo et al. 2006 [29] e Nandagopal et al. 2010 [40], obtiveram prevalências em torno de 7% a 31%, de detecção molecular do *Mycobacterium* spp. em amostras sanguíneas de soropositivos para o HIV-1,

sem diferença significativa quanto ao percentual obtido para os soronegativos [29]. No presente estudo, também não foi possível observar tal diferença sendo que, do mesmo modo, maior positividade foi observada pelo método molecular quando comparado à cultura para essas amostras ($p=0,04477$). De fato, a sensibilidade da PCR em sangue mononuclear, aqui utilizada, tem sido reportada como mais sensível que a cultura e com similar especificidade por diferentes autores [18,29,39,40]. Outra desvantagem diagnóstica da hemocultura para micobactérias em soropositivos para o HIV é que somente 40% apresentam positividade quando os níveis de TCD4⁺ estão abaixo de 200 células/mm³, como verificado para os pacientes desse estudo com pelo menos um resultado positivo por qualquer metodologia utilizada [41].

A tuberculose pleural descrita em dois pacientes soronegativos para o HIV-1 desse estudo, corrobora a descrição dessa forma como a predominante entre os casos extrapulmonares nesse grupo [3]. Já nos soropositivos para o HIV-1, em 57% dos casos (4/7) a forma predominante foi a extrapulmonar; resultados que também corroboram os níveis superiores a 50% dessa forma, já relatados para o mesmo grupo [3,11]. As infecções por *M. tuberculosis* em pacientes infectados pelo HIV-1 geralmente ocorrem em contagens de LTCD4⁺ entre 200 e 300 células/m³, enquanto que o isolamento de MNTs encontra-se aumentado em valores inferiores à 100 células/mm³ [38,39,41]. Na população estudada a detecção do *Mycobacterium* spp. por qualquer método empregado, ocorreu em níveis de LTCD4⁺ abaixo de 100 células/mm³, conforme descrito também em outras regiões do Brasil [5,36] e na Colômbia [4].

A triagem clínica cuidadosamente direcionada à pesquisa de doença por micobactérias associada à coleta e transporte otimizados das amostras biológicas, em comparação aos procedimentos rotineiramente efetuados, são fatores que fortemente contribuíram para o isolamento de *Mycobacterium tuberculosis* acima do previsto. No HB, centro regional de referência para o diagnóstico e tratamento do HIV/AIDS na região foi observada 14,3% de diagnóstico, enquanto que no IAL-SJRPreto, centro de referência para o diagnóstico da tuberculose da subdivisão XV do Estado de São Paulo, observou-se aumento de 50 %, do que o rotineiro [42]. Apesar dos frequentes relatos de multidroga resistência (MDR-TB) no Brasil, todas as cepas de *M. tuberculosis* isoladas nesse estudo foram sensíveis aos antimicobacterianos testados [2].

Em seis indivíduos cujo diagnóstico molecular positivo foi acompanhado por resultado fenotípico negativo (6/77; 7.8% de discordância), a tuberculose foi descartada pelo médico e outros diagnósticos foram estabelecidos. Esses resultados discordantes podem estar relacionados ao fato da amplificação do DNA genômico nem sempre representar bacilos viáveis ou ainda pela contaminação durante a execução laboratorial da reação, mesmo com a utilização de controles negativos da extração e amplificação e controle positivo, utilizados nesse estudo [18,22,32,33]. Tal discordância é frequentemente descrita, em percentuais ainda maiores (15,3 a 38.8%), por diferentes autores e populações, na Índia [11]; na Nigéria [43], entre outros. Casos de pacientes com infecção por micobactérias não diagnosticados, não são tratados e assim esses indivíduos continuam a disseminar bacilos. Assim é evidente a importância dos métodos moleculares como ferramentas para melhorar o diagnóstico e eficiência dos serviços de saúde [9]. Ainda, apesar de ter sido reportado, a ausência ou presença de poucas cópias (0-25 cópias) da sequência alvo IS6110, em muitas cepas de *M. tuberculosis*, muitos estudos descrevem essa sequência como a mais sensível [12,40]. Adicionalmente, o CDC recomenda que a confirmação do resultado

baseado no genoma em amostras seriadas é ideal, e caso a positividade seja obtida em pelo menos duas amostras esta deve ser interpretada como sugestiva tuberculose [44], fato que reforça a necessidade de maior investigação clínico laboratorial da doença nesses pacientes.

Resultados discordantes verificados para dois pacientes foram obtidos em espécimes clínicos coletados durante tratamento e, assim, a NPCR permitiu constatar situação de vigência terapêutica para tuberculose [33]. A descrição desse fato também foi observada previamente no Estado do Pará, Brasil [33] e na Grécia [28]. Associado aos nossos dados estes possibilitam estudos futuros abordando a possibilidade de utilizar a metodologia como marcador de sucesso terapêutico.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem a realização com amostragem mais ampla, com a inclusão de amostras seriadas e em áreas de endemicidade distinta, na direção de corroborar o potencial da técnica de NPCR com o alvo IS6110 para a detecção do genoma micobacteriano na TB extrapulmonar, com atenção especial aos pacientes imunocomprometidos; e assim estabelecer o diagnóstico e rápida terapêutica.

O protocolo de NPCR apresentado nesse estudo é adequado para o diagnóstico da TB em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, porque é simples, tem custos limitados e equipamentos comumente disponíveis em laboratórios básicos de biologia molecular. Por fim, resultados moleculares positivos não devem ser dissociados dos critérios clínicos, epidemiológicos e/ou laboratoriais de rotina para o estabelecimento do diagnóstico da TB.

Agradecimentos

A todos os indivíduos participantes deste estudo. Os autores desejam ainda agradecer aos médicos Prof. Dr. Acayaba, Profa. Dra Ida Maria Maximina Fernandes, Prof. Dr. Irineu Luiz Maia e Dra. Melissa Maia Braz, pela triagem e encaminhamento de pacientes e à Dra. Luciana Souza Jorge pela avaliação em prontuários médicos. Nós também agradecemos as técnicas de laboratório Valéria D. Fraga and Luciana C. Moran pela ajuda no processamento e encaminhamento das amostras ao Instituto Adolfo Lutz . A enfermeira Edna Castro, pela assistência na coleta de amostras e imediato transporte das amostras ao laboratório CIM e IAL. Este trabalho obteve suporte financeiro do por bolsa de pesquisa do CNPq (processo número: 576297/2008-9). A.A.C.Furini é estudante de mestrado da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

REFERÊNCIAS

1 World Health Organization Global (2009a) Tuberculosis Control – Epidemiology, strategy, financing. Chapter 1: Epidemiology. WHO, Switzerland. Available on line: www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/tbu_9.pdf

2 World Health Organization Report (2009b) Global tuberculosis control Country Profile Brazil. WHO, Switzerland . Available on line : [\[http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/bra.pdf\]](http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/bra.pdf).

3 Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (2010) Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. SVS. Brasil. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf

4 Cortés JÁ, Hidalgo P, Sánchez DLR, Serrano GAP, Gutiérrez IF (2007) Tuberculosis em pacientes com infección por VIH en el Hospital Universitario de San Ignacio 2002-2006. *Infectio* 11: 16-22

5 Cheade MFM, Ivo ML, Siqueira PHGS, Sá RG, Honer MR (2009) Characterization of tuberculosis among HIV/AIDS patients at a referral Center in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 119-125

6 Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis in the Americas: Regional Report 2008. PAHO. Available on line: [http://new.paho.org/hq/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=1344]

7 Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde (2008). Sinan Net. Casos confirmados por Ano Diagnóstico segundo Ano. Brasil. Available on line: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>

8 Centro de vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (2009) . Tb em números. CVE-SES/SP, Brasil. Available on line: http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/TB/tb_num/tb_cn08.htm

9 Marchi, A.M.; Juttel, I.D.; Kawacubo, E.M.; Dalmarco, E.M.; Blatt, S.L.; Cordova, C.M.M. (2008). Evaluation of methods for detection and identification of Mycobacterium species in patients suspected of having pulmonary tuberculosis. *Braz J Microbiol* 39(4): 613-618.

10 Selman CB, Poggi HM, Román JC, García PC, Lagos ML (2009) Análisis retrospectivo del rendimiento de Amplicor-PCR® para la detección de Mycobacterium tuberculosis em muestras respiratorias y no respiratorias con baciloscopia negativa. *Rev Chil Infect* 26: 495-498

11 Sekar B, Selvara L, Alexis A, Ravi S, Arunagiri K, Rahinavel L (2008) The utility of IS6110 sequence based polymerase chain reacton in comparison to conventional methods in the diagnosis of extra-pulmonary tyberculosis. *Indian J Med Microbiol* 26:352-355

12 Noussair L, Bert F, Guibout-Leflo V, Gayet N, Chanoine-Nicolas MH (2009) Early diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by a new procedure combining broth culture and PCR. *J Clin Microbiol* 47:1452-1457 doi: 10.1128/JCM.00066-09

- 13 Conde MB, Melo FAF, Marques ANC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin PTR et al (2009) III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. J Bras Pneumol 35: 1018-1048
- 14 Biz E, Pereira CAP, Moura LAR, Sesso R, Vaz MLS, Silva Filho AP, et al (2000) The use of cyclosporine modifies the clinical and histopathological presentation of tuberculosis after renal transplantation. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 42(4):225-30.
- 15 Sousa DG, Medeiros MMC. (2008) Systemic Lúpus Erythematosus and Renal Tuberculosis: Description of nine Cases. Rev Bras Reumatol 48:2-6
- 16 Restrepo BI, Gomez DI, Shipley GL, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. (2006) Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. J Microbiol Methods 67(2):220-29
- 17 Gopinath K, SINGH S (2009) Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium complexes* and other Mycobacterial species directly from clinical specimens. J Appl Microbiol 107: 425-435 doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04218.x
- 18 Lima JFCL, Montenegro LML, Montenegro RA et al (2009) Performance of nested PCR in the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of pediatric patients. J Bras Pneumol 33: 690-97
- 19 Poroca DR, Lima AS, Lima JFA, Cruz HLA, Montenegro RA, Melo FL, Schindler HS, Montenegro LML (2009) Differentiation of micobacteria by multiplex PCR. Rev Soc Bras Med Trop. [serial on the Internet] 42: 716-722
- 20 García-Elorriaga G, Gracida-Osorno C, Carrillo-Montes G, González-Bonilla C (2009) Clinical usefulness of the nested polymerase chain reaction in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Salud Publica Mex 51: 240-245
- 21 Liu K-T, Su W-J, Perng R-P (2007). Clinical utility of polymerase chain reaction for diagnosis of smear-negative pleural tuberculosis. J Chin Med Assoc 70(4):148-51
- 22 Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL (1999). Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. Rev Saúde Pública 33(3):281-86
- 23 Santos MLSG, Ponce MAZ, Vendramini SHF, Vila TCS, Santos NSGM, Wysochi AD, Kuyumjian FG, Gazetta CE (2009) A dimensão epidemiológica da coinfeção TB/HIV. Rev Latino Americana Enfermagem 17: 683-688 doi: 10.1590/S0104-11692009000500014

24 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. ANVISA, Brasil. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf

25 Kent PT, Kubica GP (1985) Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta.

26 Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R (2001) Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. *J Clin Microbiol* 39, 2799-2806.

27 Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SYM, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leão SC (2008) Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol* 8: 1-12 doi 10.1186/1471-2180-8-48

28 Ritis K, Tzoanopoulos D, Speletas M, Papadopoulos E, Arvanitidis K, Kartali S, Sideras P (2000) Amplification of IS6110 sequence for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in HIV-negative patients with fever of unknown origin (FUO) and evidence of extrapulmonary disease. *J Intern Med* 248: 415-424

29 Rebollo MJ, Garrido RSJ, Folgueira D, Palenque E, Díaz-Pedroch C, Lumbreras C, Aguado JM (2006). Blood and urine samples as useful sources for direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56 (2): 141-146.

30 Rossetti ML, Jardim SB, Rodrigues VF, Moura AR, Oliveira H, Zaha A (1997) Improvement of Mycobacterium tuberculosis detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J Microbiol Methods* 28:139-146.

31 Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos AS (2003) Bioestat: 3.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.

32 Kivihya-Nudgga L, Cleeff MV, Juma E, Kinwomi J, Githui W, Oskam L, Schuitema A, Sooligen DV, Nganga L, Kibuga D, Odhiambo J, Klaster P (2004) Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalence tuberculosis and human immunodeficiency virus. *Journal Clin Microbiol* 42: 1012-1015 doi 10.1128/JCM.42.3.1012-1015.2004

33 Assis NCS, Lopes ML, Cardoso NC, Costa MM, Souza CO, Lima KVB (2007) Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Bras Patol Med Lab* 43: 1-7

34 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) Hepatites virais: O Brasil está atento. ANVISA, Brasil Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/brasil_atento_3web.pdf

35 Centers for Disease Control and prevention (2009) Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents. CDC, United States of America Available from : http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/Adult_OI_041009.pdf

36 Garcia GF, Moura AS, Ferreira CS, Rcoha MOC (2007) Clinical and radiographic features of HIV-related pulmonary tuberculosis according to the level of immunosuppression. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 622-626

37 Erdozain JG, Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Martinez-Berriotxo A, Aguirre C (2006) High risk of tuberculosis in systemic lupus erythematosus? *Lupus* 15 : 232-235

38 Oplustil CT, Leite OHM, Oliveira MS, Sinto SI, Uip DE, Boulos M, Mendes CF (2001) Detection of Mycobacteria in the bloodstream of patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome in a University Hospital in Brazil. *Braz J Infect Dis* 5: 252-259

39 Nakatani SM, Burger M, Assef MC, Brockelt SR, Cogo LL, Messias-Reason IJT (2004) Efficient method for mycobacterial DNA extraction in blood cultures aids rapid PCR identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 851-854 doi 10.1007/s10096-004-1236-z

40 Nandagopal SS, Lingesan K, Appu KC, Sridharan G, Gopinathan AK (2010) Evaluation of a nested PCR targeting IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of the organism in the leukocyte fraction of blood samples. *Indian J Med Microbiol* 28 (3): 227-232

41 Bacha HA, Cimernam S, Souza SA, Hadad DJ, Mendes CMF (2004) Prevalence of Mycobacteremia in patients with AIDS and persistent fever. *Braz J Infect Dis* 8(4):290-95

42 Pedro HSP, Pereira MIF, Goloni MRA, Ueki SYM, Chimara E (2008) Nontuberculous mycobacteria isolated in São José do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005. *J Bras Pneumol* 34:950-955

43 Ani A, Okpe S, Akambi M, Ejelionu E, Yakubu B, Owolodun O, Ekeh P, Oche A, Tyem D, Idoko J (2009) Comparison of a DNA based PCR method with conventional methods for the detection of *M. tuberculosis* in Jos, Nigeria. *J Infect Dev Ctries* 3(6):470-75

44 Centers for Disease Control And Prevention (2009) Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. CDC United States of America Available on line:

F:\Updated Guidelines for the Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis.mht

Tabela 1: Distribuição dos 77 pacientes de acordo com os critérios de inclusão do estudo, com subdivisão em soropositivos e soronegativos para o HIV-1.

Crítérios de Inclusão	Soropositivos	Soronegativos	Total
Tosse com ou sem expectoração, febre diária, perda de peso e/ou derrame pleural	37	5	42
Cefaléia e febre	9	2	11
Hepatoesplenomegalia e febre	2	1	3
Linfoadenomegalia	1	2	3
Utilização de Imunossupressores	0	5	5
Tosse, febre diária, perda de peso e uso imunossupressores	0	13	13
Total	49	28	77

Tabela 2: Resultados obtidos a partir do diagnóstico fenotípico (BAAR e cultura) e molecular (NPCR - IS6110) para detecção do *Mycobacterium* spp. em 109 espécimes clínicos de indivíduos soropositivos e soronegativos para o HIV-1.

Espécimes Clínicos (109)	Baciloscopia		Cultura			NPCR IS6110	
	(+)	(-)	(+)	(-)	*	(+)	(-)
Amostras Pulmonares (24)	5	19	4	18	2	7	17
Sangue (57)	3	54	3	53	1	10	47
Líquor (16)	0	16	2	14	0	5	11
Aspirado de linfonodo/secreção ganglionar (3)	1	2	0	2	1	1	2
Aspirado/Biópsia de Médula Óssea (2)	0	2	0	2	0	0	2
Fragmento de Pleura/Líquido Pleural (3)	1	2	0	3	0	2	1
Fragmento hepático (3)	0	3	0	3	0	0	3
Líquido ascítico (1)	0	1	0	1	0	1	0
Total: 109	10	99	9	96	4	26	83

* cultura contaminada

NPCR versus baciloscopia em amostras pulmonares e extrapulmonares (S= 80%; E=87%; VPP=38%; e VPV=97%).

NPCR versus cultura em 22 amostras pulmonares (S= 100%; E=83%; VPP=57% e VPV=100%).

NPCR versus cultura em 81 amostras extra-pulmonares (S= 100%; E=82%; VPP=17% e VPV=100%).

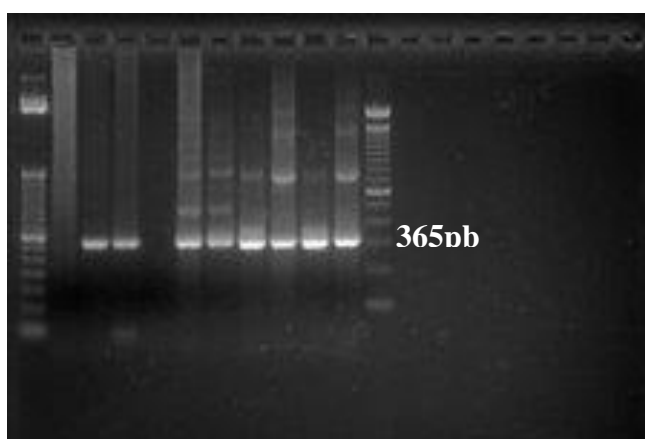


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose demonstrando os amplicons de 365bp, produto da amplificação por *NPCR* do elemento de inserção *IS6110*. M: marcador (Low Mass Ladder - Invitrogen®) Faixa 1, controle negativo da extração; Faixas 2, 3, 5, 6, 7, 8 pacientes do estudo; Faixa 4, controle negativo da PCR; Faixas 9 e 10, quantidades seriadas de DNA genômico, com respectivamente 100pg e 1pg de cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ; M: marcador (Low Mass Ladder - Invitrogen®)

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

As seguintes conclusões puderam ser obtidas a partir da população com suspeita de doença pelo complexo *Mycobacterium* spp., avaliada neste estudo:

-O perfil sócio-demográfico observado acompanha a tendência da tuberculose e da infecção pelo HIV-1 no Estado de São Paulo;

- A candidíase oro-esofágica, a hepatite C e a neurotoxoplasmose são as co-morbidades mais frequentes nos soropositivos para o HIV. A presença dos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico reforça a importância da investigação laboratorial de micobactérias em imunossuprimidos;

- O isolamento de micobactérias, foi superior a 50% a rotina do IAL-SJRPreto, centro de referência para o diagnóstico da tuberculose da subdivisão XV do Estado de São Paulo;

- A detecção do *Mycobacterium* spp. ocorreu em indivíduos cujos níveis de linfócitos TCD4+ estavam abaixo de 100 células/ mm³ no momento da coleta;

- A *Nested-PCR* tem sensibilidade de 80% e especificidade de 86% quando comparada a baciloscopia;

- O desempenho da NPCR frente a cultura, para amostras pulmonares (n=22) e extrapulmonares (n=83) é similar (100% de sensibilidade e aproximadamente 83% de especificidade). A positividade pela NPCR é significativamente maior que o isolamento por cultura entre as amostras extrapulmonares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kritski AL, Villa TS, Trajman A, Lapa e Silva JR, Medronho RA, Ruffino Netto A. Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas. Rev Saude Publica 2007; 41 Supl 1:9-14
2. CDC. Centers for Disease Control And Prevention. Tuberculosis. Data and Statistics, 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/statistics/default.htm>. Acesso em 10/02/2010.
3. Lindoso JAL, Lindoso AABP. Neglected tropical diseases in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2009; 51(5):247-53.
4. WHO. World Health Organization Global. Tuberculosis Control – Epidemiology, strategy, FINANCING. Chapter 1: Epidemiology. (2009) Disponível em: www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/tbu_9.pdf. Acesso em 15/01/2010.
5. WHO. World Health Organization Report Global tuberculosis control Country Profile Brazil. (2009) Disponível em: http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/bra.pdf. Acesso em: 16/01/2010.
6. Gopinath K, SINGH S. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium complexes*

and other Mycobacterial species directly from clinical specimens. J Appl Microbiol 2009; 107: 425-35.

7. PAHO. Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis in the Americas: Regional Report 2008. Disponível em: [http://new.paho.org/hq/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=1344]. Acesso em 22/03/2010.

8. CVE. Centro de vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Tb em números. CVE-SES/SP, Brasil. 2009. Disponível em : http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/TB/tb_num/tb_cn08.htm. Acesso em 12/02/2010.

9. SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde. Sinan Net. Casos confirmados por Ano Diagnóstico segundo Ano. Brasília: 2008 Disponível em :<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>. Acesso em 10/04/2010.

10. Tovo CV, Santos DE, Mattos AZ, Mattos AA, Santos BR, Galperim B. Avaliação da imunidade celular nos pacientes co-infectados pelo vírus da hepatite C e vírus da imunodeficiência humana. Arq. Gastroenterol 2007; [serial on the Internet]; 44(2):113-17.

11. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico.AIDST. CRT- DST/AIDS. CVE. ANO XXV. Nº 1. [citado 2008 Dez]. Disponível em: <http://www.crt.saude.sp.gov.br/content/dreruslith.mm>. Acesso em 18/01/2010.
12. Murcia MI, León CI, Hoz F, Saravia J. Asociación micobacterias- VIH-SIDA em pacientes atendidos em um Hospital Universitário em Bogotá, Colômbia. Revista Salud Publica 2007; 9(1): 97-05.
13. Lannoy LH, Escalante JJC, Evangelista MSN, Romero GAS. Tuberculosis incidence and risk factors among patients living with HIV/AIDS in public health service institutions in Brasilia, Federal District. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41(6):549-55.
14. Noussair L, Bert F, Guibout-Leflo V, Gayet N, Chanoine-Nicolas MH. Early diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by a new procedure combining broth culture and PCR. J Clin Microbiol 2009;47:1452-57.
15. Ueki SYM, Martins MC, Telles MAS, Virgilio MC, Giampagia CMS, Chimara E, et al . Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. J Bras Patol Med 2005; 41, (1) 1-8.
16. Zamarioli LA, Coelho AGV, Pereira CM, Nascimento ACC, Ueki SYM, Chimara E. Estudo descritivo da freqüência de micobactérias não tuberculosas na Baixada Santista (SP). J Bras Pneumol 2008;34(8): 590-94.

17. Selman CB, Poggi HM, Román JC, García PC, Lagos ML. Análisis retrospectivo del rendimiento de Amplicor-PCR® para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* em muestras respiratorias y no respiratorias con baciloscopia negativa. *Rev Chil Infect* 2009; 26:495-98.
18. Hatta M, Sultan AR, Tandirogang N, Masjudi, Yadi. Detection and identification of mycobacteria in sputum from suspected tuberculosis patients. *BMC Res Notes* 2010;6:1-6.
19. Ferraz JC; Mello FBS, Albuquerque MFPM, Montenegro SML, Abath FGC. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(11):1387-97.
20. Piersimoni C, Scarparo C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(5):323-34.
21. Pedro HSP, Pereira MIF, Goloni MRA, Ueki SYM, Chimara E. Nontubercylous mycobacteria isolated in São José do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005. *J Bras Pneumol* 2008; 34:950-55.
22. Poroca DR, Lima AS, Lima JFA, Cruz HLA, Montenegro RA, Melo FL, Schindler HS, Montenegro LML. Differentiation of micobacteria by multiplex PCR. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; [serial on the Internet] 42: 716-22.

23. Davoudi S, Rassolinegad M, Younesian M, Hajiabdolbaghi M, Soudbakhsh A, Jafari S, EmadiKouchak H, Mehrpouya M, Lofti H. CD4⁺ cell counts in patients with different clinical manifestations of tuberculosis. *Braz J of Infect Dis* 2008 12 (6):483-86.
24. Lemos ACM. Co-infecção tuberculose/HIV. *J Bras Pneumol* 2008;34(10):753-55.
25. Nakatani SM, Messias-Reason LJT, Burger M, Cunha CA. Prevalence of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in blood cultures of Brazilian AIDS patients after introduction of highly active retroviral therapy. *Braz J Infect Dis* 2005;9(6):459-63.
26. Jamal LF, Moherdau F. Tuberculosis and HIV infection in Brazil: magnitude of the problem and strategies for control. *Rev Saude Publica*, 2007: 41 Supl1 104-10.
27. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. SVS. Brasil, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf. Acesso em 10/05/2010

28. Centro de vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Tuberculose. Coordenadoria de Controle de Doenças. Micobacterioses. Recomendações para o diagnóstico e tratamento. 2005. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/MNT_Final_9-12-05a.pdf. Acesso em 13/09/2009.

29. Nakatani SM, Burger M, Assef MC, Brockelt SR, Cogo LL, Messias-Reason IJT. Efficient method for mycobacterial DNA extraction in blood cultures aids rapid PCR identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23:851-54.

30. García-Elorriaga G, Gracida-Osorno C, Carrillo-Montes G, González-Bonilla C. Clinical usefulness of the nested polymerase chain reaction in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Salud Publica Mex 2009;51:240-45.

31. Ani A, Okpe S, Akambi M, Ejelionu E, Yakubu B, Owolodun O, Ekeh P, Oche A, Tyem D, Idoko J. Comparison of a DNA based PCR method with conventional methods for the detection of *M. tuberculosis* in Jos, Nigeria. J Infect Dev Ctries, 2009,3(6):470-75.

32. Conde MB, Melo FAF, Marques ANC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin PTR, et al . III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. J Bras Pneumol 2009;35(10):1018-48.

33. Cho CH, Han SH, Chin BS, Choi SH, Lee HS, Kim CO, et al. Diagnosis and species identification of Mycobacterial infections by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of sterile body fluids. *Korean J Intern Med* 2009;42(2):135-38.
34. Bacha HA, Cimernam S, Souza SA, Hadad DJ, Mendes CMF. Prevalence of Mycobacteremia in patients with AIDS and persistant fever. *Braz J Infect Dis* 2004; 8(4):290-95.
35. Rodrigues MAV, Serafini AB, Pereira MS, Silva TDS, Rabahi MF, Alves SL, et al. Standardization of in-house Polymerase Chain Reaction for the Identification of Mycobacterium tuberculosis at the Reference Tropical Disease Hospital in the State of Góias, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(4):415-19.
36. Bhattacharya B, Karak K, Ghosal AG, Roy A, Das S, Dandapat P, et al. Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Trop Med Int Health* 2003;8: 150-57.
37. Assis NCS, Lopes ML, Cardoso NC, Costa MM, Souza CO, Lima KVB. Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Bras Patol Med Lab* 2007; 43: 1-7.

38. Sekar B, Selvara L, Alexis A, Ravi S, Arunagiri K, Rahinavel L. The utility of IS6110 sequence based polymerase chain reaction in comparison to conventional methods in the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26:352-55
39. Lima JFCL, Montenegro LML, Montenegro RA, Cabral MML, Lima AS, Abath FGC, et al. Performance of nested PCR in the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of pediatric patients. *J Bras Pneumol* 2009;33:690-97.
40. Biz E, Pereira CAP, Moura LAR, Sesso R, Vaz MLS, Silva Filho AP, et al. The use of cyclosporine modifies the clinical and histopathological presentation of tuberculosis after renal transplantation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000;42(4):225-30.
41. Sousa DG, Medeiros MMC. Systemic Lúpus Erythematosus and Renal Tuberculosis: Description of nine Cases. *Rev Bras Reumatol* 2008;48:2-6.
42. Castro CM, Puerto G, García LM, Orjuela DL, Polo CL, Garzón MC, et al. Identificación molecular de micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción, Colombia 1995-2005. *Biomedica* 2007;27(3):439-46.
43. CDC. Centers for Disease Control And Prevention. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. United States of America. 2009. Disponible em: F:\Updated Guidelines for the

Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis.mht.
Acesso em 15/01/2010.

44. Barouni AS, Saridakis HO, Vidotto MC. Detection of Mycobacterium in clinical samples by multiprimer polymerase chain reaction. Braz J Microbiol 2004;35:29-32.

45. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. Rev Saúde Pública 1999;33(3):281-86.

46. Restrepo BI, Gomez DI, Shipley GL, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. J Microbiol Methods 2006;67(2):220-29.

47. McEvoy CR, Falmer AA, Gey Van Pittius NC, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2007;87(5):393-04.

48. Sun JR, Perng CL, Lu JJ. Detecting Mycobacterium tuberculosis in Bactec MGIT 960 cultures by Inhouse IS6110-based PCR assay in routine clinical practice. J Formos Med Assoc 2009;108(2):119-25.

49. Negi SS, Anand R, Pasha ST, Gupta S, Basir SF, Khare S, et al. Diagnostic potential of IS6110, 38 KDA, 65 KDA and 85b sequence based

polymerase chain reaction in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25(1):43-9.

50. Nava Paz O, Manzur H, Lisbeth P. Evaluación de la baciloscopia, cultivo y recacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. *Kasmera* 2005;33(2):119-31.

51. Liu K-T, Su W-J, Perng R-P. Clinical utility of polymerase chain reaction for diagnosis of smear-negative pleural tuberculosis. *J Chin Med Assoc* 2007;70(4):148-51.

52. Abath FG, Melo FL, Werkhauser RP, Montenegro L, Montenegro R, Schindler HC. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. *BioTechniques* 2002;33(6):1210-14.

53. Flores E, Rodríguez JC, Garcia-Pachón E, Soto JLK, Ruiz M, Escribano I, Royo G. Real-time PCR with internal amplification control for detecting tuberculosis: method design and validation. *APMIS* 2009;117:592-97.

54. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SYM, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leão SC. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol* 2008; 8:1-12.

55. Santos MLSG, Ponce MAZ, Vendramini SHF, Vila TCS, Santos NSGM, Wysochi AD, Kuyumijian FG, Gazetta CE. A dimensão epidemiológica da coinfeção TB/HIV. *Rev Latino Americana Enfermagem* 2009; 17:683-88.

APÊNDICES

APÊNDICE I

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa chamada “Pesquisa imunológica e molecular do *Mycobacterium* spp. em uma população de crianças e adolescentes do Noroeste paulista.” Esse projeto, coordenado por mim e pela Prof.^a Dr.^a Andréa Regina Baptista Rossit, vai estudar os micróbios causadores de doença no peito, no coração, no sangue e em menor número de vezes, na cabeça, na coluna, nos rins e em outras partes do corpo em seu(ua) filho(a). A sua participação consiste em permitir, caso queira, que os médicos ou enfermeiros, colem um pouco de sangue, da urina e realizem teste de resposta ao micróbio no braço, dependendo do indicado pelo médico pediatra. Esse último exame testa se o germe estudado já entrou em contato com seu filho e, por isso, não indica doença. Além disso, é seguro e não tem contra-indicação. Para sua realização é necessário que a enfermeira treinada faça a injeção de pequena quantidade de líquido entre a pele e o músculo (sub-cutânea) com leitura do resultado em uma segunda visita (72 hs). Por necessidade de diagnóstico, o material coletado será enviado, caso você consinta, para o Centro de Investigação de Microrganismos da FAMERP onde usaremos metodologia mais avançada (molecular) para avaliar os micróbios. Vale a pena lembrar que todos temos micróbios em nosso organismo e que apenas em algumas situações especiais eles podem causar doença.

Queremos deixar claro que o seu nome ou de seu filho (a) nunca será divulgado. Durante a pesquisa, você poderá tirar qualquer dúvida a respeito do trabalho e, se necessário, entrar em contato com os coordenadores da mesma, Prof.^a Dr.^a Andréa Rossit no telefone 017- 3201-5909, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Você também não terá nenhuma despesa com essa pesquisa. O material por você cedido destina-se apenas a análise científica e não será comercializado ou fornecido como resultado de análise clínica. Caso tenha dúvidas sobre esse acordo ou alguma questão que não tenha sido esclarecida, você ainda poderá entrar em contato com a Comissão de Ética dessa Faculdade (0xx17 – 3201-5700 R. 5813).

São José do Rio Preto,/...../.....

Nome da criança da pesquisa:.....

Assinatura dos Pais ou responsáveis:.....

Endereço:.....Telefone:.....

Número do prontuário:.....Médico Responsável:.....

Pesquisadoras Responsáveis: Mestranda Adriana Antônia da Cruz Furini e Prof.^aDr.^a Andréa Regina Baptista Rossit

FAMERP - Centro de Investigação de Microrganismos

FONE: (0xx17) 3201-5909 e (0xx17) 97743857

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 Vila São Pedro – CEP 15090-000

APÊNDICE II

FLUXOGRAMA PARA COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS POR:
CISTRANS – TRANSPLANTE RENAL E AMBULATÓRIO DE NEFROLOGIA;
PED – SERVIÇO DE PEDIATRIA E CIRURGIA PEDIÁTRICA
RT – AMBULATÓRIO DE REUMATOLOGIA
DDIP – DEPARTAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS
HB – FUNFARME; FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO
PRETO – FAMERP

PEDIDO DE EXAME (azul) - ANOTAR A SIGLA – RE



COLETA E CONSERVAÇÃO DA AMOSTRA (PROTOCOLO)
Sangue: temperatura ambiente
Escarro, Lavado Gástrico, Lavado Brônquico, Urina, Biópsias, LCR: refrigeração de 2º
a 8º C



ENVIAR A AMOSTRA PARA DIP – 2º andar
Dúvidas: Prof.^a Andréa, Valéria, Luciana Ramal 5736
Dra. Célia Franco – Ramal 5006
Recolhimento da amostra pelo CIM (3 vezes ao dia)



CENTRO DE INVESTIGAÇÃO DE MICRORGANISMOS - CIM
ANOTAÇÕES NO LIVRO: DOENÇAS NEGLIGENCIÁVEIS
ENVIO AO INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Até o dia seguinte as 12:00 hs

APÊNDICE III

“FICHA CLÍNICA, LABORATORIAL, SÓCIODEMOGRÁFICA E EPIDEMIOLÓGICA DOS PACIENTES ENVOLVIDOS NO ESTUDO”

Ficha Epidemiológica

Nº do Prontuário:.....

Nome:.....

Sexo: ()F ()M Idade:.....Local de nascimento:.....

Data de nascimento:.....

Etnia: ()Branca ()Negra ()Mulata ()Oriental ()Outras

Moradia: Área Rural () Urbana ()Semi urbana ()Periferia ()Ignorado

Profissão:.....

Soropositivo para o HIV/AIDS: ()Sim ()Não Ano de diagnóstico do HIV:.....

Escolaridade: < 4 anos () 4-8 anos () > 8 anos () ignorada ()

Detenção: ()Sim ()Não ()exdetento Tatuagens: ()Sim ()Não

Risco Sexual: ()Sim ()Não ()Ex Droga endovenosa: ()Sim ()Não ()Ex

Tabagismo: ()Sim ()Não ()Ex

Realização de Teste de Sensibilidade a Tuberculina nos 2 últimos anos: ()Sim ()Não

Hemoterapia: Sim () Não () Ano:

ASPECTOS CLÍNICOS

Já teve diagnóstico de tuberculose: () Sim () Não Ano:

- Diagnóstico: ()Clínico () Laboratorial

- Agente etiológico: Gênero e espécie

- Sítio de isolamento: () Pulmonar () Extrapulmonar

Já fez uso de antimicobacterianos: ()Sim () Não Ano:.....

-Período de tempo em meses:

- () Pirazinamida () Rifampicina () Isoniazida () Etambutol () Estreptomina
() etionamida

Terapia imunossupressora:.....

Número de internações:.....

Transplantado: () Sim () Não

Terapia antiretroviral: () Sim () Não

Medicamentos:.....

.....

Carga Viral:..... Contagem de CD4⁺:..... e CD8⁺:..... Data:...../...../.....

Outras co-morbidades: (Citomegalovírus, Hepatite B e C, Toxoplasmose, Candidíase, Herpes zoster, Sífilis, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatóide; etc) – Especificar nome e ano de diagnóstico

.....

.....

Óbito: () Sim () Não

Causa óbito:.....

RESULTADOS LABORATORIAIS

Espécime clínico 1, 2, 3, 4, 5:.....

Data do espécime clínico:

Resultado da baciloscopia do espécime clínico :

- negativa () 1 cruz () 2 cruces () 3 cruces ()

Resultado da cultura do espécime clínico: Gênero e espécie

Teste de sensibilidade aos antimicobacterianos:

- Pirazinamida: () Sensível () Resistente () Não se aplica

- Rifampicina: () Sensível () Resistente () Não se aplica

- Isoniazida: () Sensível () Resistente () Não se aplica

- Estreptomicina: () Sensível () Resistente () Não se aplica

- Etambutol: () Sensível () Resistente () Não se aplica

Resultado da Nested-PCR do espécime clínico:

ANEXO I

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

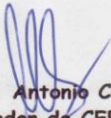
Parecer n.º 064/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo nº 2535/2009 sob a responsabilidade de **Andréa Regina Baptista Rossit** com o título "Doenças negligenciadas: contribuição nos diagnósticos da Tuberculose, Doença de Chagas e Malária" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 13 de abril de 2009.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP

**FICHA PARA REQUISIÇÃO DE EXAMES DE TUBERCULOSE PARA O
INSTITUTO ADOLFO LUTZ-SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, LABORATÓRIO DE
MICOBACTÉRIAS - SEÇÃO DE BIOLOGIA MÉDICA PARA O DIAGNÓSTICO
FENOTÍPICO**

RE **B**

Requisição de Exames TUBERCULOSE		DATA DE ENTREGA / /	Nº GERAL
UNIDADE REQUISITANTE			DIR
NOME		Nº DA MATRÍCULA	
ENDEREÇO			
DATA DE NASCIMENTO / /	IDADE	SEXO	<input type="checkbox"/> MASCULINO <input type="checkbox"/> FEMININO
MATERIAL ENVIADO			
<input type="checkbox"/> ESCARRO OUTRO: _____			
DIAGNÓSTICO		<input type="checkbox"/> CONTROLE DE TRATAMENTO	
<input type="checkbox"/> 1ª AMOSTRA	<input type="checkbox"/> AMOSTRA		
<input type="checkbox"/> BACILOSCOPIA	<input type="checkbox"/> CULTURA	<input type="checkbox"/> IDENTIFICAÇÃO	<input type="checkbox"/> TESTE DE SENSIBILIDADE
RESULTADO			
BACILOSCOPIA			
AMOSTRAS DE ORIGEM EXTRA-PULMONAR			
<input type="checkbox"/> POSITIVA	<input type="checkbox"/> NEGATIVA	<input type="checkbox"/> NÃO REALIZADO	
ESCARRO			
<input type="checkbox"/> NÃO REALIZADO	<input type="checkbox"/> NEGATIVA	<input type="checkbox"/> POSITIVA (+)	<input type="checkbox"/> POSITIVA (++) <input type="checkbox"/> POSITIVA (+++)
CULTURA			
<input type="checkbox"/> EM ANDAMENTO	<input type="checkbox"/> POSITIVA	<input type="checkbox"/> NÃO REALIZADA	<input type="checkbox"/> NEGATIVA <input type="checkbox"/> CONTAMINADA
IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE SENSIBILIDADE			
<input type="checkbox"/> EM ANDAMENTO	<input type="checkbox"/> NÃO REALIZADA		
DATA / /	RESPONSÁVEL		

ANEXO III

PROTOCOLO PARA COLETA E ENVIO DE AMOSTRAS PARA: INSTITUTO ADOLFO LUTZ E CENTRO DE INVESTIGAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROJETO DOENÇAS NEGLIGENCIÁVEIS

- **Amostras:** escarro, lavado brônquico, lavado gástrico, aspirado de linfonodo, sangue periférico e urina

ESCARRO:

- **Frasco para coleta:** potes plásticos, descartáveis, com boca larga (50mm de diâmetro), transparente, tampa de rosca (40mm), capacidade de 35 a 50 ml

- **Volume ideal:** entre 5 a 10 ml

- **Considerações sobre a coleta:** expectoração espontânea ou coleta de escarro induzida por nebulização com solução salina hipertônica (5mL de Na Cl 3%) durante 5 e no máximo 10 minutos (no frasco deve ser indicado que a coleta foi realizada por indução)

-**Conservação da amostra:** refrigeração de 2°C a 8° C por 1 dia

LAVADO BRÔNQUICO

- **Frasco para coleta:** frasco ou tubo limpo esterilizado e ser transportada rapidamente para o laboratório.

- **Volume ideal:** superior a 5 ml

- **Conservação da amostra:** refrigeração de 2°C a 8° C por 1 dia

LAVADO GÁSTRICO

- **Frasco para coleta:** frasco estéril contendo solução tampão de carbonato de sódio a 10% para neutralizar a ação do suco gástrico.

- **Número de amostras:** duas amostras em dias consecutivos

-**Considerações sobre a coleta:** a coleta deve ser realizada quando o paciente acorda, antes de levantar-se e comer.

-**Conservação:** refrigeração de 2°C a 8° C por 1 dia

URINA

- **Horário de Coleta:** após cuidadosa higiene local, coletar a 1ª micção da manhã.
- **Frasco para coleta:** em frascos limpos, e esterilizados
- **Volume ideal:** mínimo de 40 mL
- **Número de amostras:** recomenda-se a coleta de no máximo três amostras em dias consecutivos
- **Conservação:** refrigeração de 2°C a 8°C por 1 dia

Obs. Não se recomenda a coleta de urina de 24 horas

LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

- **Frasco para coleta:** frascos ou tubos esterilizados
- **Volume ideal:** mínimo de 5 mL
- **Conservação:** temperatura ambiente

SANGUE

- **Volume da amostra:** 5 mL de sangue após assepsia local, utilizando-se uma seringa sem anticoagulante e colocar este volume diretamente no frasco de hemocultura identificado com dados do paciente:
 - 1- remova a tampa plástica do frasco;
 - 2- desinfete com gaze ou algodão embebido em álcool ou similar;
 - 3- inocule o sangue sem anticoagulante diretamente no frasco junto ao leito do doente;
 - 4- passe gaze com álcool novamente;
 - 5- adicione assepticamente 1 mL de líquido de enriquecimento MB/Bact no frasco de hemocultura (este líquido pode ser inoculado antes do sangue, porém a estabilidade dele é rápida, e se ocorrer alguma intercorrência na hora da coleta o frasco terá que ser inutilizado);
 - 6- transporte a temperatura ambiente ao abrigo da luz solar direta). Os frascos de hemocultura antes da coleta devem ser conservados à temperatura ambiente (15-30 ° C) ao abrigo da luz solar direta.

E outra amostra com 5 mL de sangue em tubo de vacutainer com EDTA

- **Conservação:** temperatura ambiente – nunca refrigerar

FRAGMENTOS DE TECIDOS - BIÓPSIAS

- **Tamanho da Amostra:** mínimo 2mm

- **Frasco para coleta:** frascos ou tubos limpos, esterilizados, contendo solução fisiológica 0,9% estéreis. NÃO UTILIZAR PARAFINA OU FORMOL.

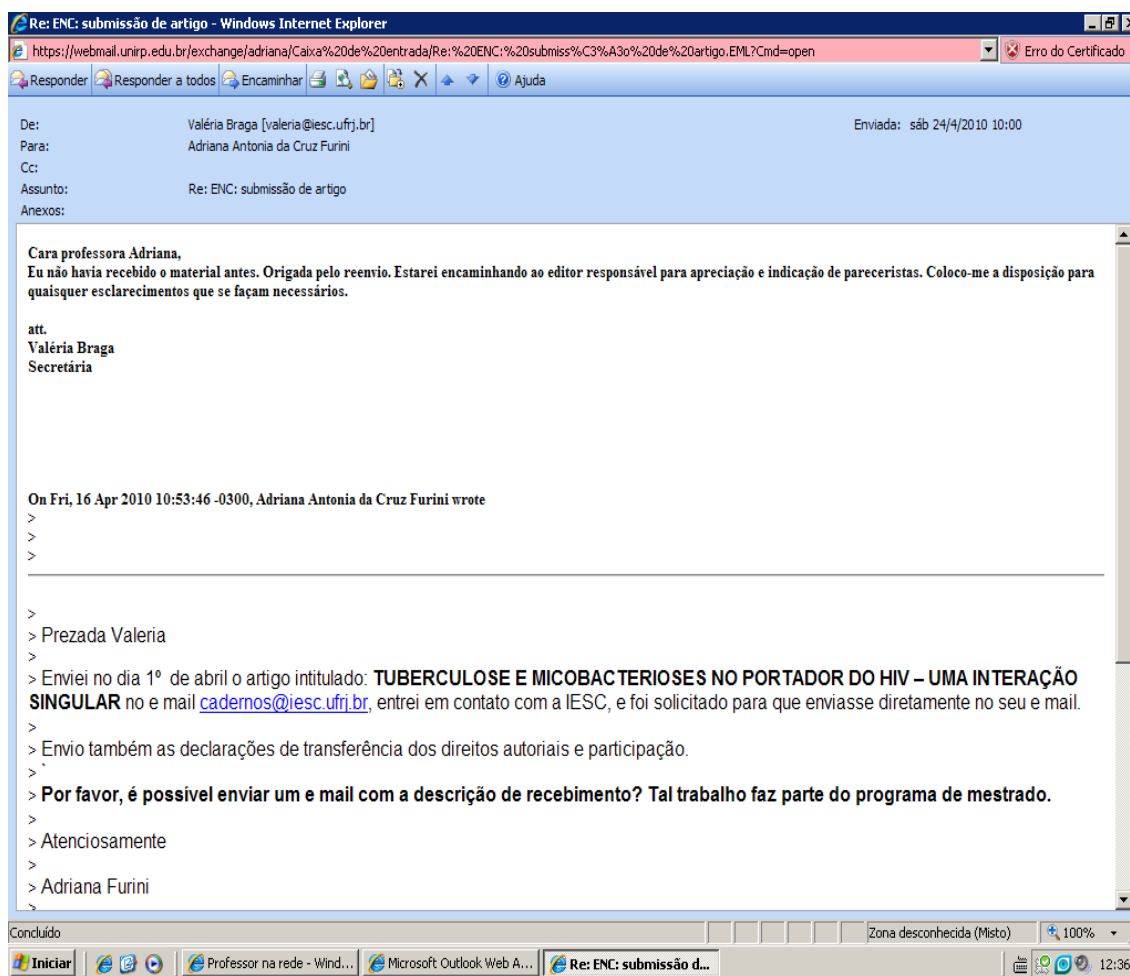
- **Armazenamento:** refrigeração de 2°C a 8° C por 1 dia

Referência Bibliográfica

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008.

ANEXO IV

**CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO
TUBERCULOSE E MICOBACTERIOSES NO PORTADOR DO HIV – UMA
INTERAÇÃO SINGULAR PARA REVISTA CADERNOS DE SAÚDE
COLETIVA**




ANEXO V

**CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO A INFECÇÃO
POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS NA INFÂNCIA – UM DESAFIO DIAGNÓSTICO
PARA REVISTA ARQUIVOS DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Artigo de Revisão

Entrada X

☆ de andrea-regina@vm.uff.br [ocultar detalhes](#) 14 jul  [Responder](#) ▼

para mara@famerp.br

cc [ricardomachado <ricardomachado@famerp.br>](mailto:ricardomachado@famerp.br),
cruzdri@ig.com.br

data 14 de julho de 2010 15:23

assunto Artigo de Revisão

enviado por vm.uff.br

Prezada Mara

Conforme contato telefônico prévio do Prof. Ricardo Machado, encaminho em anexo artigo a ser considerado para publicação como Revisão no periódico Arquivos em Ciências da Saúde.

Agradeço sua cooperação.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Andréa Regina Rossit
Depto de Microbiologia e Parasitologia
Instituto Biomédico - Universidade Federal Fluminense

ANEXO VI

25 CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA



GIAMPAGLIA, CMST

1. IAL: Instituto Adolfo Lutz
2. CVE/SP: Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo

C01 - 013 - EVALUATION OF ORAL ANTISEPTICS USE FOR REDUCTION OF THE CONTAMINATION RATE OF MYCOBACTERIA CULTURES IN SPUTUM SAMPLES OF PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS
PERES, R. L.; LOUREIRO, R. B.; DIETZ, R.; PALACI, M.; MACIEL, E. L. N.
1. UNIFES: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES-ES

C01 - 014 - COMPARAÇÃO DA CARGA BACILAR EM AMOSTRAS DE ESCARRO DE PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR, COLETADAS NO PERÍODO DE 0,5; 5 E 12 HORAS
NASCIMENTO, CP; SIQUEIRA, MG; PALACI, M; HADAD, DJ; DIETZ, R.
1. UFES: Centro Biomédico/Universidade Federal do Espírito Santo

C01 - 015 - ESTUDO COMPARATIVO DE EFREGAÇÃO DE BACILOSCOPIA DA TUBERCULOSE PULMONAR SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) E MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS)
PEDRO, H.S.P.; COELHO, A.G.V.; FERREIRA, M.P.2; GOLONI, M.R.2; NASCIMENTO, A.C.C.3; ALVES, I.3; ALY, D.C.G.4; GALLE, L.C.5; SILVA, R.F.6; HARDI, S.M.T.7,9; LEITE, A.R.7; SHIKAMA, M.L.8; UEKI, S.Y.M.1
1. IAL - Central; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Laboratório Central; 2. IAL - S. João del-Rei; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - São José do Rio Preto; 3. IAL - Santos; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Santos; 4. IAL - Rio Claro; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Rio Claro; 5. IAL - Pres. Prudente; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Presidente Prudente; 6. IAL - St. André; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Santo André; 7. IAL - Taubaté; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Taubaté; 8. IAL - Sorocaba; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Sorocaba; 9. IAL; INSTITUTO LAURO DE SOUZA/LIMA

C01 - 016 - INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E FORMA DE INCUBAÇÃO NO PRIMO ISOLAMENTO DE MYCOBACTERIUM BOVIS. RESULTADOS PARCIAIS
IKUTA, C.Y.; MORATO, F.; VALASSOURA, T.A.; FERREIRA, F.; DIAS, R.A.; SOUZA, G.O.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA-NETO, J.S.
1. USP, Depto Med Vet Prev e Saude Animal/PMVZ

C01 - 017 - AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE DA BACILOSCOPIA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE (RSR2008)
FREIRE, C.M.1; TORRES, C.F.L.1; PAULINO, C.X.1; LOPES, M.C.S.1; VILAR, A.C.2; TERRA, A.C.1; QUEIROZ, M.G.L.1; ALMEIDA, Z.G.S.1
1. LACEN-RN; Laboratório Central Dr Almino Fernandes
2. HRLGV; Hospital Regional Lindolfo Gomes Vidal

C01 - 018 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE RPOB DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSISEM AMOSTRAS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA DO ESTADO DE GOIÁS
SANTOS, L.C.; BOUSQUET, HM; PEREIRA, AM; JUNQUEIRA-KIPNIS, AP; KIPNIS, A
1. UFG-IP/SP, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

C01 - 019 - IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTÉRIAS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENE ISP 65
RAMOS, J.P.; CAMPOS, C.E.D.; CALDAS, P.C.S.; DISTASIO, L.C.; BARRETO, A.M.W.
1. CRPH/ENSPI/Fluoz; Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSPI/Fluoz

C01 - 020 - ATIVIDADE ANTIMICROBACTERIANA DE NAFITIMIDAZOIS DERIVADOS DE QUINOLINAS NATURAIS
COELHO, T.S.1; MOURA, K.C.G.2; RAMOS, D.F.1; PINTO, A.V.2; PINTO, M.C.F.R.2; SILVA, P.E.A.1
1. FURG; Faculdade de Medicina
2. UFRJ; Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais

C01 - 021 - CIÊNCIA PARA QUE E PARA QUEM? DESENVOLVIMENTO E INTRODUÇÃO DE NOVOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A TUBERCULOSE
MACEDO, M.B.1; VALENÇA, M.S.1; SOARES, R.O.1; FÉLIX, C.R.2; ROCHA, J.Z.1; SILVA, P.B.A.2; RAMOS, D.F.2; VON GROLL, A.3; SILVA, P.E.A.1
1. FURG; Universidade Federal do Rio Grande
2. UFPEL; Universidade Federal de Pelotas
3. ITM; Instituto de Medicina Tropical de Antárctica

C01 - 022 - PERFIL CLÍNICO, EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DOS PACIENTES COM HANSEIASE DIAGNOSTICADA EM SANTOS, SÃO PAULO, BRASIL
ZAMAROLI, L.A.1; COELHO, A.G.V.C.1; NASCIMENTO, A.C.C.1; FERREIRA, C.M.1; ROCHA, S.E.2; FONSECA, F.3; MATOS JUNIOR, J.C.M.3; CAVALLHEIRO, R.A.3
1. IAL - SANTOS; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - LABORATÓRIO REGIONAL SANTOS
2. SECD; LABORATÓRIO MUNICIPAL DE SANTOS
3. UNIMES, UNIMES - Universidade Metropolitana de Santos

C01 - 023 - CONFIRMAÇÃO MOLECULAR POR PCR IS6110 DAS BACILOSCOPIAS PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR NO MUNICÍPIO DE ANANINDEUA, PARA
EMILYV, CONCEIÇÃO, I.; MICHELE, BRITO, S.2,1; ISHARI, FURLANETTO, I.; GEORGE, LIMA, Z.; ANA, COSTAS; RENE, SILVA, A.4; ALEJANDRO PRADO, A.4; KARLALIMAS
1. UFPA; Universidade Federal do Pará
2. LACEN-PA; Laboratório Central do Pará
3. IEC; Instituto Evandro Chagas
4. CESUPA; Centro Universitário do Pará

C01 - 024 - IDENTIFICAÇÃO E DELEÇÃO DE UMA REGIÃO DO

DNA DO MYCOBACTERÍOFAGO D29 PARA INSERÇÃO DE GENES QUE EXPRESSAM PROTEÍNAS FLUORESCENTES PELA TÉCNICA DE RECOMBINAÇÃO EM BACTERIOFAGOS POR ELETROPORAÇÃO DE DNA
DA SILVA, JOÃO S.; PIURI, MZ; ACB BRITO; BASTOS GM1; SOUZA W1; HIRATA, RDS1; HATFULL GP2; HIRATAMHI
1. USP; Universidade de São Paulo
2. UNIV. PITTS; University of Pittsburgh

C01 - 025 - RESEARCH OF NEW MIXED-CHELATE COPPER COMPLEXES WITH QUINOXALINE AND ALANINE AS LIGANDS, POTENTIAL ANTIMYCOBACTERIAL AGENTS
PAVAN, F.R.1; FARAJEZO, M.C.2; COSTA-FILHO, A.J.3; VEIRA, E.D.3; MONGE, A.4; BORTHAGARAY, G.6; GAMBINO, D.6; TORRE, M.H.6; LEITE, C.O.F.1
1. UNESP; Faculdade de Ciências Farmacêuticas;
2. UNIMED; Unilab
3. USP; Instituto de Física de São Carlos
4. UFPA; Universidade de Navarra
5. UNESP; Instituto de Química
6. UDELAR; Cátedra de Química

C01 - 026 - NOVAS PROTEÍNAS COM POTENCIAL PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE
RAMOS, D.F.1; BORSUK, S.1; SILVA, PEA2; DELLAGOSTIN, O.1
1. UFPEL; Centro de Biotecnologia/Universidade Federal de Pelotas
2. FURG; Laboratório de Micobactérias/Faculdade de Medicina

C01 - 027 - IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTÉRIAS PELO PRA-PCR EM UM LABORATÓRIO DE ROTINA DE UM HOSPITAL GERAL
BENSLEPA, L.2; PANUNTO, AC.2; PANUNTO, PC.2; DENTINI, P.1; RAMOS, MC.2
1. UNICAMP; Depto. Patologia Clínica/Universidade Estadual de Campinas
2. UNICAMP; Fac. de Ciências Médicas/Universidade Estadual de Campinas

C01 - 028 - IMPORTÂNCIA DE REPIQUE PARA A RECUPERAÇÃO DE CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COM RESULTADOS INVAÍVEIS NO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE PELO MÉTODO AUTOMATIZADO DEMGT 960
PINHEIRO, M.; MARTINS, C.; GIAMPAGLIA, CM; OLIVEIRAS, I.
1. IAL; INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Setor de Micobactérias

C01 - 029 - RHUTENIUM (III) PHOSPHINE-PICOLINATE COMPLEXES AS ANTIMYCOBACTERIAL AGENTS
PAVAN, F.R.1; POELHITZ, G.V.2; DO NASCIMENTO, F.B.3; LEITE, S.R.A.4; BATISTA, A.A.3; DEFLON, V.M.5; SATO, D.N.6; FRANZBLAU, S.G.7; LEITE, C.O.F.1
1. UNESP; Faculdade de Ciências Farmacêuticas
2. UFGO; Departamento de Química
3. UFSCAR; Departamento de Química
4. UNESP; Instituto de Química
5. USP; Instituto de Química de São Carlos
6. IAL; Instituto Adolfo Lutz
7. IUC; Institute for Tuberculosis Research

C01 - 030 - AVALIAÇÃO DO PROGRAMA DE CONTROLE DE QUALIDADE DA BACILOSCOPIA DA TUBERCULOSE - PROJETO FUNDO GLOBAL - NA REGIÃO DA COSTA DA MATA ATLÂNTICA, 2007 E 2008
CHOU, AC; COELHO, A.G.V.; ZAMAROLI, L.A.; PEREIRA, C.M.
1. IAL; Santos; Instituto Adolfo Lutz de Santos

C01 - 031 - DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À ISONIAZIDA E RIFAMPICINA COM A UTILIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (RT-PCR) EM CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
OLIVEIRA, RS1; GONÇALVES, MG2; FUKASAWA, LO2; SALGADO, MM2; HARRISON, LH3; SACCHI, CT2
1. IAL; Instituto Adolfo Lutz - Seção de Bacteriologia
2. IAL; Instituto Adolfo Lutz - Seção de Imunologia
3. Univ Pittsburgh; Department of Epidemiology / University of Pittsburgh

C01 - 032 - TRANSMISSÃO VERTICAL DE MYCOBACTERIUM BOVIS NA ESPÉCIE BOVINA
JOERGE, K.S.G.1; OSÓRIO, A.L.A.R.1; AZAMBUJA, A.D.1; SILVA, C.G.1; SANTOS, A.C.B.2; LEITE, C.O.F.2; CUNHA, R.V.3
1. FAMEZ-UFMS; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
2. FOPAR-UNESP; Faculdade de Ciências Farmacêuticas
3. FAMED-UFMS; Faculdade de Medicina

C01 - 033 - INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM UM MUNICÍPIO PRIORITÁRIO PARA A TUBERCULOSE DO NOROESTE PAULISTA
FURINI, A. A. C.1; PEDRO, H. S. P.4; CONCEIÇÃO, L. M.1; OLIVEIRA, M.S.C.1; RODRIGUES, J. F.1.3; MACHADO, R. L. D.1; MONTENEGRO, L. M. L.2; SCHINDLER, H. C.2.5; FRANCO, C.6; ROSSI, A. R. B.1
1. FAMEDP; CMI/Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
2. CPqAM/Fio Cruz; Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
3. UNIRP; Centro Universitário de Rio Preto
4. IAL; Micobactérias/Instituto Adolfo Lutz
5. UFPE; Materno-Infantil/Universidade Federal de Pernambuco
6. FUNFARM; DDIP/Fundação Faculdade Regional de Medicina

C01 - 034 - AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE NA DETERMINAÇÃO DO "CUT-OFF" DE UM PROTOTIPO DE KIT PARA DETECÇÃO DE DNA DO COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS UTILIZANDO MICROPLAÇAS
VERZA, M.1; MICHELON, C.T.1; NUNES, N.M.1; REZENDE, L.2; ROSSETTI, M.L.R.1.3
1. FEPPS; CDCT
2. Ampigenix Biotech
3. ULBRA; ULBRA

C01 - 035 - INVESTIGAÇÃO DE MYCOBACTÉRIAS NÃO CAUSADORAS DE TUBERCULOSE EM RONDÔNIA

MEENDES DE LIMA, I.2; OLIVEIRA, M.S.C.1; RODRIGUES, R.S.2.2.1; SANTOS, A.M.A.1.2.1; MOURA, M.M.F.2
1. LACENRO; LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE RONDÔNIA
2. UNIRRO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

C01 - 036 - II INQUÉRTO NACIONAL DE RESISTÊNCIA ÀS DROGAS: RESULTADOS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. IMPORTÂNCIA DO ÁCIDO P-NITROBENZOICO (PNB) NA IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
MONZ, L.L.1; SIMEÃO, FCS1; YAMAUCHI, JUJ; COSTA, SM1; OLIVEIRA, RS1; LATRILHA, FO1; GIAMPAGLIA, CMST; MARTINS, MC1; TELLES, MAST
1. IAL; Instituto Adolfo Lutz - Setor de Micobactérias
2. DEVEP/SVMS; Serviço de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde

C01 - 037 - OPTIMIZATION OF REAL-TIME PCR AIMING AT THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS
ASSUNÇÃO, T.M.1.2; DIAS, A.C.O.1; BASSO, L.A.1.2; SANTOS, D.S.1.2; BATISTA, E.L.1
1. INCT-TB; Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional
2. PPGBCM PUCRS; Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular

C01 - 038 - PERFIL DE ÁCIDOS MICÓLICOS DE NOVAS ESPÉCIES DE MYCOBACTÉRIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
CONTE, JUNIOR, C.A.1; PAULA, L.V.1; FURLANETTO, L.V.1; FIGUEIREDO, E.E.S.1; ASENSI, G.F.1; WALTER, L.2; SILVA, J.T.1; PASCHALINI, W.F.1
1. UFRJ; Depto Bioquímica (Instituto de Química)
2. UFF; Depto de Microbiologia (Instituto Biomédico)

C01 - 040 - PESQUISA DO GÊNERO MYCOBACTERIUM EM AMOSTRAS DE SECREÇÕES DE VIAS AÉREAS DE ORIGEM HOSPITALAR
SANTO, H.S.1; BASAGNI, N.S.1; CANETTI, A.C.V.1; MARIA, A.3; TEODORO, G.R.2; KOGA, T.O.2; KHOURI, S.1
1. UNINAP; NUFAB/ Lab. Microbiologia/Faculdade de Ciências da Saúde
2. UNESP; Biotécnicas e Diagnóstico Bucal/FOUSJ/ São José dos Campos
3. IAL; Instituto Adolfo Lutz

C01 - 041 - AVALIAÇÃO DO TESTE RÁPIDO MUNDICROMATOGRAFICO TB AG NPPTA TEST BIOESAY NA IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
VINHAS, S.V. SILVA, J.P. AGUIAR, P.P.L. MARQUES, H.S. DEL PIERO, K.O. PALACI, M. LIMA, P.F.F.E
1. NDI-UFES; Núcleo de Doenças Infecciosas - UFES

C01 - 042 - IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE LINHAGENS DE MYCOBACTÉRIAS PELO MÉTODO DE MULTIPLEX-PCR
BENSLEPA, L.; PANUNTO, AC.2; PANUNTO, PC.2; DENTINI, P.2; RAMOS, MC.2
1. UNICAMP; Depto. Patologia Clínica/Universidade Estadual de Campinas
2. UNICAMP; Fac. de Ciências Médicas/Universidade Estadual de Campinas

C01 - 043 - RESISTÊNCIA BACTERIANA ÀS DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE TUBERCULOSE EM RONDÔNIA
RODRIGUES, R.S.1; MENDES DE LIMA, C.A.2; MOURA, M.M.F.1
1. UNIRRO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
2. LACENRO; LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE RONDÔNIA

C01 - 044 - IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO "COMPLEXO" MYCOBACTERIUM TERRAE ATRAVÉS DE METODOLOGIA DO PRA (PCR E ANÁLISE DE ENZIMAS POR RESTRIÇÃO)
DISTASIO, L.C.; PORPHIRO, B.C.; CALDAS, P.C.S.; SILVA, M.V.B.; BARRETO, A.M.W.; CAMPOS, C.E.D.
1. CRPH/ENSPI/Fluoz; Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSPI/Fluoz

C01 - 045 - AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM AMOSTRAS DE LIQUOR DE PACIENTES COM MENINGITE TUBERCULOSA
GONÇALVES, M.G.1; FUKASAWA, L.O.1; SALGADO, M.M.1; GUALBERTO, F.A.S.2; VIDAL, J.Z.; OLIVEIRA, A.C.P.2; ARAUJO, T.P.1; CUSTÓDIO, A.V.1; HARRISON, L.H.3; SACCHI, C.T.1
1. IAL; Instituto Adolfo Lutz
2. IIER; Instituto de Infectologia Emilio Ribas
3. Pitt; Universidade de Pittsburgh

C01 - 046 - DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES RELACIONADAS COM A RESISTÊNCIA A RIFAMPICINA E ISONIAZIDA EM ISOLADOS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS UTILIZANDO MICROPLAÇAS
MASCHMANN, R.A.1.2; FERREIRA, S.J.2; SILVA, M.S.N.2; ZAHA, A.1; ROSSETTI, M.L.R.2.1
1. UFRGS; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
2. FEPPS/CDCT; FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PRODUÇÃO E PESQUISA EM SAÚDE

C01 - 047 - APLICABILIDADE DE UM ELISA IN-HOUSE PARA PARATUBERCULOSE BOVINA NO SORODIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CROHN
GUIMARÃES, F.B.1; CARVALHO, A.C.S.2.1; BOGHAT, N.L.F.3; ZALTMAN, C.2; SALGADO, V.L.C.2; MARASSI, C.D.1; OLEMMANN, W.M.R.1
1. MPPG; Depto. de Imunologia do Instituto Prof. Paulo de Góas
2. GED; Serviço de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva
3. IDT; Unidade de Pesquisa em Tuberculose

MINI-COMUNICAÇÃO**AREA: Micobacteriologia (Divisão C) - PAINEL: 033****SUB-AREA: C01 - Micobactérias: métodos diagnósticos e testes de sensibilidade (moleculares e não moleculares)****Investigação molecular do *Mycobacterium tuberculosis* em um município prioritário para a tuberculose do Noroeste paulista.**

Autores FURINI, A.A.C^{1;3}; PEDRO, H. S. P⁴; CONCEIÇÃO, L. M¹;
 OLIVEIRA, M.S.C¹; RODRIGUES, J. F^{1;3}; MACHADO, R. L. D¹;
 MONTENEGRO, L. M L²; SCHINDLER, H. C^{2;5}; FRANCO, C.⁶;
 ROSSIT, A. R.B¹

Instituição 1. FAMERP; CIM /Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; Av Brigadeiro Faria Lima, 5416 São José do Rio Preto
 2. CPqAM/Fio Cruz; Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães; Av Professor Moraes Rego s/n Recife
 3. UNIRP; Centro Universitário de Rio Preto; Rua Yvette Gabriel Atique,45 São José do Rio Preto
 4. IAL; Micobactérias/Instituto Adolfo Lutz; Rua Alberto Sufredini Bertoni, 2325 São José do Rio Preto
 5. UFPE; Materno-Infantil/Universidade Federal de Pernambuco; Av. Professor Moraes Rego, 1325 Recife
 6. FUNFARME; DDIP/Fundação Faculdade Regional de Medicina; Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 São José do Rio Preto

Resumo:**INTRODUÇÃO**

O diagnóstico da tuberculose paucibacilar constitui desafio, em especial para pacientes soropositivos para o HIV/doentes de AIDS, transplantados, portadores de doenças reumáticas e crianças. O objetivo desse trabalho foi o de comparar o método fenotípico e molecular de detecção do *Mycobacterium tuberculosis* (MT) em pacientes diferencialmente susceptíveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas baciloscopia, cultura automatizada em sistema BacT/ALERT, e amplificação por Nested-PCR do elemento de inserção IS6110 para investigação de MT em 60 amostras pulmonares (n=16) e extrapulmonares (n=44) de 42 pacientes. Dessas, 3 eram de crianças, 42 de HIV/doentes, 7 de insuficientes renais/transplantados renais e 8 de doentes reumáticos sob terapia imunossupressora. Para estatística foram empregados os Testes de McNemar e

Kappa (BioEstat v. 3.0) com nível de significância de 5%.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Após cultura e Nested-PCR, quatro amostras (escarro) forneceram resultado positivo em ambas metodologias (6,7%; 2 pacientes) com índice de positividade de 25% (15 pacientes) pelo método molecular. Todas as oito amostras de sangue positivas pela Nested-PCR (n=8 pacientes) forneceram resultados negativos em hemocultura. Tanto a baciloscopia quanto a cultura foram negativos em amostras positivas pela PCR de escarro (1), líquido (3) e biópsia pleural (1) obtidas de cinco indivíduos soropositivos para o HIV-1. Houve discordância quando comparados os resultados da cultura versus Nested-PCR (Teste de Kappa; $p = 0,0030$ e Teste de McNemar; $p = 0,0026$) com maior positividade pelo método molecular, independente do espécime clínico ou grupo de pacientes. A carga microbiana insuficiente pode explicar esse achado, pois a maioria dos pacientes aqui incluídos são paucibacilares. Outra possibilidade é a da terapêutica antimicobacteriana dificultar crescimento em cultura ou, por outro lado, a contaminação em laboratório favorecer positividade via análise molecular. No entanto, controles negativos e positivos foram aqui utilizados, conforme recomendado.

CONCLUSÃO

Apesar do aumento na capacidade de detecção de MT via método molecular, anteriormente referido, tal ferramenta é incapaz de determinar a viabilidade de MT. Desse modo, a análise de todas as ferramentas diagnósticas associadas à interpretação clínica, permite a definição da tuberculose doença.

Apoio Financeiro: CNPq 576297/2008-9

Palavras-chaves: Diagnóstico molecular, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, Tuberculose