

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA**

**ALINE MIREILLE DA CUNHA FIÉVEZ**

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE (PCR) E MÉTODOS CONVENCIONAIS  
NO DIAGNÓSTICO DE MICOBACTERIOSE  
EXTRAPULMONAR EXCETO RENAL**

**FORTALEZA**  
**2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM PATOLOGIA

ALINE MIREILLE DA CUNHA FIÉVEZ

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE (PCR) E MÉTODOS CONVENCIONAIS  
NO DIAGNÓSTICO DE MICOBACTERIOSE  
EXTRAPULMONAR EXCETO RENAL**

Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador:  
Prof. Dr. José Luciano Bezerra Moreira.

Co-orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Cunha Frota.

FORTALEZA  
2005

F48a Fiévez, Aline Mireille da Cunha

Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) e métodos convencionais no diagnóstico de micobacteriose extrapulmonar exceto renal / Aline Mireille da Cunha Fiévez. – Fortaleza, 2005.

99. : II.

Orientador: Prof. Dr. José Luciano Bezerra Moreira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.

1. *Mycobacterium tuberculosis* 2. Infecções por *Mycobacterium* 3. Reação em Cadeia da Polimerase 4. Tuberculose I. Moreira, José Luciano Bezerra (Orientador) II. Frota, Cristiane Cunha (co-orientadora) III. Universidade Federal do Ceará – Curso de Pós-graduação em Patologia IV. Título.

CDD 616.995

ALINE MIREILLE DA CUNHA FIÉVEZ

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE  
(PCR) E MÉTODOS CONVENCIONAIS NO DIAGNÓSTICO  
DE MICOBACTERIOSE EXTRAPULMONAR EXCETO  
RENAL**

Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre.

Data da Aprovação: 28/02/2005

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Luciano Bezerra Moreira.  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Cunha Frota.  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coêlho.  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. José Wellington de Oliveira Lima.  
Universidade Estadual do Ceará

## **AGRADECIMENTOS**

Expresso agradecimentos a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a elaboração deste ensaio e para a realização do mestrado.

*Ao Professor Doutor José Luciano Bezerra Moreira*, por sua paciência, orientação, seus questionamentos, recomendações e por todo o por mim apoio recebido na realização desta pesquisa.

*À Professora Doutora Cristiane Cunha Frota*, pela forma gentil e oportuna com que compartilhou comigo suas percepções e seus conhecimentos.

*À Professora Doutora Vaulice Sales Café e aos funcionários do Laboratório Central do Hospital Universitário Walter Cantídio - UFC* pela obtenção das amostras e acesso aos procedimentos laboratoriais e resultados.

*À bioquímica Creuza Lima Campelo, do Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará*, por sua ajuda para que eu obtivesse as amostras, pelo exemplo de entusiasmo, profissionalismo e incentivo.

*Ao CNPq*, pelo apoio financeiro disponibilizado em meu benefício para a realização deste programa de mestrado.

*À UFC e aos professores do Curso de Mestrado em Patologia*, pelos conhecimentos, auxílio e incentivos recebidos.

*À Paula da Paz Palácio*, por toda atenção, gentileza e incentivo.

*Aos colegas da turma 2001.2 do Mestrado em Patologia*, pelas horas gastas em conjunto, em árduos estudos, e pelos momentos de alegria e prazer durante este tempo de convivência.

*Aos demais membros da banca examinadora*, pelas sugestões.

*Quem reconhece a sua ignorância revela a mais profunda sapiência. Quem ignora a sua ignorância vive na mais profunda ilusão.*

*(Lao – Tse).*

## RESUMO

Com o objetivo de enfatizar a importância do diagnóstico laboratorial de micobactérias em sítios extrapulmonares, exceto renal, utilizou-se neste trabalho a reação em cadeia da polimerase (PCR). Na PCR foram empregados iniciadores específicos para a detecção de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MNTB). Foram comparados os resultados obtidos na PCR com os métodos microbiológicos convencionais. Foram analisadas 114 amostras clínicas (líquidos corporais) provenientes de pacientes internados ou em atendimento ambulatorial, com suspeita clínica de tuberculose extrapulmonar, exceto renal. As amostras foram coletadas no período de 2001 a 2003 e cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC-UFC) e pelo Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (LACEN-CE). A baciloscopia e a cultura foram negativas em todas as amostras. A pesquisa molecular para o gênero *Mycobacterium* foi positiva em dez amostras e, para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, foi negativa em todas as amostras.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose extrapulmonar.

## ABSTRACT

In order to focus on the importance of laboratorial diagnosis of extrapulmonary mycobacteria, except renal, we employed the polymerase chain reaction (PCR). Clinical samples (body fluids) were tested by PCR for the presence of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) and nontuberculous mycobacteria (MNTB). We compared the results obtained through the PCR with the ones obtained through conventional microbiological methods. The 114 clinical samples were obtained from internal patients or from or in ambulatorial attendance with clinical suspicion of extrapulmonary tuberculosis, except renal. The samples were collected from 2001 to 2003, and ceded to this research by the Laboratório de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC-UFC), and by the Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (LACEN-CE). The direct microscopy and culture were negative in all the samples. The molecular research, for the *Mycobacterium* genus was positive in 10 samples, and for the *Mycobacterium tuberculosis* complex was negative in all the samples.

**Key-words:** *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, nontuberculous mycobacteria, extrapulmonary tuberculosis.

## LISTA DE TABELAS

1	Situação estimada de casos novos de tuberculose nos 22 países prioritários, segundo a Organização Mundial da Saúde em 2002.....	19
2	Distribuição de casos de tuberculose notificados no Brasil em 1999.....	21
3	Coeficientes de incidência de tuberculose no Brasil em 1999.....	22
4	Histórico da evolução dos métodos laboratoriais micobacteriológicos.....	25
5	Métodos diagnósticos.....	27
6	Escala semi-quantitativa padronizada pela Organização Mundial da Saúde....	36
7	Esquema de classificação de Runyon (1950).....	41
8	Espécies de <i>Mycobacterium</i> causadoras de infecções humanas.....	42
9	Provas bioquímicas indicadas para identificação das micobactérias não tuberculosas.....	42
10	Doenças causadas por micobactérias não tuberculosas no homem.....	46
11	Esquemas terapêuticos recomendados para o tratamento de micobacterioses..	48
12	Distribuição das amostras clínicas analisadas.....	57
13	Protocolo para preparação do <i>mix</i> de reagentes da PCR.....	64
14	Etapas da amplificação de DNA micobacteriano utilizando os iniciadores 16S-23S rRNA (gênero- específico).....	65
15	Etapas da amplificação do DNA micobacteriano, utilizando os iniciadores IS6110 (espécie- específico).....	66
16	Resultados obtidos pelos métodos microbiológicos e pesquisa molecular por PCR, na detecção de micobactérias, em 114 amostras de pacientes com suspeita clínica de micobacteriose extrapulmonar.....	70

## ***LISTA DE ILUSTRAÇÕES***

FIGURA 1	Teste de Mantoux em um paciente reator forte.....	29
FIGURA 2	Bacilo álcool-ácido resistente (BAAR).....	36
FIGURA 3	Colônia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	37
FIGURA 4	Esquema dos processos realizados numa reação em cadeia da polimerase (PCR).....	53
FIGURA 5	Esquema de uma reação de <i>Nested</i> PCR.....	54
FIGURA 6	Seqüência dos procedimentos laboratoriais realizados neste estudo.....	59
FIGURA 7	Seqüência dos procedimentos realizados na pesquisa molecular... ..	60
FIGURA 8	Seqüência dos iniciadores do gene 16S-23S para identificação do gênero <i>Mycobacterium</i> .....	61
FIGURA 9	Representação esquemática da localização e seqüência dos iniciadores do gene 16S-23S rRNA.....	62
FIGURA 10	Seqüência dos iniciadores de IS6110 para identificação do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	62
FIGURA 11	Representação esquemática da localização e seqüência dos iniciadores do gene Rv2168c de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	63
FIGURA 12	Termociclador (Perkin-Elmer, GeneAmp PCR System 9700).....	66
FIGURA 13	Corrida eletroforética.....	68
FIGURA 14	Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação da PCR 16S-23S rRNA.....	68
GRAFICO 1	Distribuição da tuberculose extrapulmonar no Brasil em 2001.....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a. C – antes de Cristo

ADA – Adenosinadeaminase

AIDS/SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ATS – Sociedade Americana do Tórax

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

BCG – Bacilo Calmette e Guérin

BK – Bacilo de Koch

CDC - Centers for Disease Control and Prevention – Centros de Controle e Prevenção de Doenças

DMSO – Dimetil-sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Oligonucleotídeos

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HUWC - UFC – Hospital Universitário Walter Cantídio

LACEN - CE – Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.

LCR – Líquido cefalorraquidiano

L-J – Meio de cultura de Lowenstein-Jensen

*M. tb* – *Mycobacterium tuberculosis*

MAI/MAC – Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*

MNTB – Micobactérias não tuberculosas

MS – Ministério da Saúde

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*

NEG – Resultado negativo

WHO / OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PNB – Ácido p- nitrobenzóico

PPD – Derivado protéico purificado

RNA – Ácido ribonucléico  
rRNA – Ácido ribonucléico ribossomal  
Tb – Tuberculose  
TBE – Tris-borato-EDTA  
TBMR – Tuberculose multirresistente  
TE – Tris EDTA  
TEP – Tuberculose extrapulmonar  
TRIS – Tris Borato EDTA  
UT – Unidades tuberculínicas  
Z-N – Coloração de Ziehl-Neelsen

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1	Histórico.....	17
2.2	Epidemiologia da tuberculose.....	18
2.2.1	A tuberculose no mundo.....	18
2.2.2	A tuberculose no Brasil.....	19
2.2.3	A tuberculose no Ceará.....	23
2.3	Agente etiológico.....	23
2.4	Avaliação clínica da tuberculose pulmonar.....	25
2.4.1	Teste de sensibilidade à tuberculina (Teste de Mantoux).....	28
2.4.2	Radiografia de tórax.....	29
2.5	Tuberculose extrapulmonar.....	30
2.5.1	Tuberculose pleural.....	31
2.5.2	Tuberculose pericárdica.....	32
2.5.3	Tuberculose peritoneal.....	32
2.5.4	Meningite tuberculosa.....	33
2.5.5	Tuberculose osteoarticular.....	34
2.5.6	Outras formas de tuberculose extrapulmonar.....	34
2.6	Diagnóstico bacteriológico da tuberculose.....	35
2.6.1	Baciloscopia.....	35
2.6.2	Cultura.....	37
2.6.3	Métodos rápidos de detecção de cultivos automatizados.....	38
2.7	Micobactérias não tuberculosas (MNTB).....	39
2.8	Diagnóstico bacteriológico das micobactérias não tuberculosas.....	40
2.8.1	Baciloscopia.....	31
2.8.2	Cultura.....	41
2.8.3	Teste de sensibilidade aos antimicobacterianos.....	46
2.9	Diagnóstico de tuberculose e de micobacterioses por PCR.....	48
2.9.1	Componentes da PCR.....	51
2.9.2	Princípio do método.....	52

2.9.3	Nested PCR.....	53
2.9.4	Automação do procedimento.....	54
2.9.5	Detecção e análise dos produtos amplificados.....	55
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
4.1	Amostras.....	57
4.2	Procedimentos de rotina microbiológica.....	58
4.2.1	Baciloscopia.....	58
4.2.2	Cultura.....	58
4.2.3	Identificação micobacteriana ao nível de espécie.....	59
4.3	Procedimentos para utilização da PCR.....	60
4.3.1	Extração do DNA micobacteriano.....	61
4.3.2	Amplificação do DNA micobacteriano.....	61
4.3.2.1	Iniciadores utilizados na identificação do gênero <i>Mycobacterium</i> .....	61
4.3.2.2	Iniciadores utilizados na identificação do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ...	62
4.3.2.3	Reagentes da reação em cadeia da polimerase.....	63
4.3.2.4	Controles da reação em cadeia da polimerase.....	64
4.3.2.5	Protocolos de amplificação.....	64
4.3.2.6	<i>Nested</i> PCR.....	67
4.3.2.7	Revelação do fragmento amplificado.....	67
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
5.1	Pacientes e amostras.....	69
5.2	Resultados microbiológicos.....	69
5.3	Resultados da reação em cadeia da polimerase.....	70
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que inclui as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti* (BRASIL, 1994; MURRAY *et al.*, 1998; KRITSKI *et al.*, 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que haja cerca de 8 a 9 milhões de casos novos de tuberculose e 3 milhões de óbitos por ano no mundo. Para o Brasil, a incidência é de 124 mil casos novos por ano (RUFFINO-NETO, 2001).

Para que a tuberculose seja, do ponto de vista epidemiológico, uma doença controlada, é necessário que haja um diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos casos. No diagnóstico da tuberculose pulmonar bacilífera, a baciloscopia e a cultura apresentam resultado satisfatório em aproximadamente 90% dos casos (BRASIL, 2002). As infecções causadas por micobactérias não tuberculosas, denominadas de micobacterioses, são diagnosticadas basicamente pelas mesmas técnicas de diagnóstico da tuberculose.

Nos casos de tuberculose extrapulmonar e nas micobacterioses, onde as amostras obtidas são, na maioria das vezes, paucibacilares, os métodos convencionais de diagnóstico são pouco sensíveis e demorados, impossibilitando a identificação rápida ao nível de espécie.

A identificação da espécie é indispensável para o diagnóstico diferencial entre estas duas doenças, que apresentam diferenças fundamentais em sua epidemiologia, prognóstico e tratamento (CORRÊA DA SILVA, 1993; FIUZA DE MELO e AFIUNE, 1993; AFIUNE, 1996; ATS, 1997; LEITE *et al.*, 1997; KONEMAN *et al.*, 2001).

Neste contexto, a reação em cadeia da polimerase (PCR), por ser uma técnica de amplificação *in vitro*, que amplifica em algumas horas seqüências específicas de DNA, diretamente das amostras clínicas (EISENACH *et al.*, 1990), foi escolhida para a realização deste estudo, que visa à inclusão de um método mais rápido, sensível e específico na rotina laboratorial, para a detecção de micobactérias

do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MNTB), em pacientes com suspeita clínica de tuberculose extrapulmonar, exceto renal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

A tuberculose é uma doença infecciosa que acompanha a história do homem. Há relatos de evidências de tuberculose espinhal em esqueletos de 8000 anos a.C. e de 5000 anos a.C., encontrados em 1904, num cemitério neolítico perto de Heildeberg, na Alemanha. Arqueólogos observaram lesões em colunas vertebrais, conhecidas como *Mal de Percival Pott*, em múmias egípcias de 3000 anos a.C.. Afirma-se que a doença já existia desde 3500 anos a.C.. Hindus e chineses já descreviam quadros clínicos semelhantes à tuberculose desde 2000 anos a.C.. Aproximadamente no ano de 380 a.C., Hipócrates denominou a doença como “tísica”, que significa “derreter-se” ou “fundir-se”, em razão do seu caráter consumptivo (KRITSKI, 2000 *et al.* MARCH, 2002).

Somente na segunda metade do século XIX, foi possível conhecer o agente etiológico da doença, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), então denominado *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como bacilo de Koch (BK), em homenagem ao seu descobridor, o médico e pesquisador alemão Robert Koch, que o descreveu em 1882 (LEITE *et al.*, 1997).

Após a descoberta do agente etiológico da tuberculose e com o aparecimento de drogas antituberculosas, nas décadas de 1940 e 1950, a tuberculose começou a ser efetivamente combatida e até imaginou-se que a doença tenderia a um efetivo controle. Nos anos de 1980, entretanto, constatou-se seu recrudescimento em todo o mundo. Este agravamento da situação epidemiológica da tuberculose decorre do aumento da pobreza no mundo, da falência dos sistemas públicos de saúde, dos elevados índices de abandono de tratamentos antes da eliminação do bacilo, do incremento de formas multirresistentes do bacilo e do surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (FIÚZA DE MELO, 1996).

## **2.2 Epidemiologia da tuberculose**

### **2.2.1 A tuberculose no mundo**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que haja anualmente três milhões de mortes por tuberculose, 98% delas em países em desenvolvimento e cerca de 350.000 óbitos em casos de associação da tuberculose com a AIDS.

O número anual de casos novos de tuberculose é estimado em cerca de 8,7 milhões, sendo que 80% estão concentrados em 22 países, entre eles o Brasil. A tuberculose multirresistente (TBMR) está presente em 63 dos 72 países que participaram de um inquérito mundial realizado no período de 1994-1999.

Do total de casos novos de tuberculose estimados pela OMS, menos da metade é notificada e esta situação traduz a insuficiência das políticas de controle. Nos 22 países com maior carga de casos novos de tuberculose, a estimativa é de que ocorram 6.910.000 casos novos anuais. Neste grupo, a Índia ocupa a 1ª posição, com 1.856.000 casos novos anuais, enquanto o Brasil ocupa a 15ª, com 116.000 e o Afeganistão a última posição com 70.000. Se classificados pelo coeficiente de incidência, o Zimbabwe, que está em 21º lugar em número absoluto de casos, assume a liderança, com 584/100.000 habitantes, e o Brasil ocuparia o 22º lugar, com uma estimativa de 68/100.000 (TABELA 1) (OMS, 2002).

**TABELA 1 – Situação estimada de casos novos de tuberculose nos 22 países prioritários, segundo a Organização Mundial da Saúde em 2002**

Índia (1.856.000)	África do Sul (228.000)	Uganda (82.000)
China (1.365.000)	Rússia (193.000)	Miamar (80.000)
Indonésia (595.000)	Congo (163.000)	Moçambique (79.000)
Nigéria (347.000)	Quênia (149.000)	Camboja (75.000)
Bangladesh (332.000)	Vietnã (148.000)	Zimbabwe (74.000)
Etiópia (249.000)	Tanzânia (126.000)	Afeganistão (70.000)
Filipinas (249.000)	<b>Brasil (116.000)</b>	
Paquistão (247.000)	Tailândia (88.000)	

**Total de casos novos nos 22 países prioritários = 6.910.000**

**Total de casos novos no mundo = 8.735.000**

Fonte: OMS / WHO Report – 2002.

Caso a gravidade deste quadro não se reverta, teme-se que até 2020, um bilhão de pessoas serão infectadas, 200 milhões adoeçam e 35 milhões possam morrer (RAVIGLIONE *et al.* 1995; HIJJAR *et al.* 2001; RUFFINO-NETO, 2001).

### **2.2.2 A tuberculose no Brasil**

No Brasil, quando diagnosticada, a tuberculose é uma doença de notificação obrigatória aos órgãos de saúde. O Ministério da Saúde (MS) ao longo do tempo acompanha os dados notificados. Em 1999, foram notificados 78.628 casos novos de tuberculose (coeficiente de incidência de 48,0 por 100 mil habitantes); as formas pulmonares alcançaram 66.307 e, destas, 41.434 foram positivas a baciloscopia (coeficiente de incidência de 25,3 por 100 mil habitantes); já as formas extrapulmonares alcançaram 12.153 (coeficiente de incidência de 7,4 por 100 mil habitantes). Em virtude das desigualdades socioeconômicas, observa-se uma variação dessa taxa em diferentes regiões. No mesmo ano (1999), a taxa de incidência por todas as formas da doença variou de 82,7 a 78,1 por 100 mil habitantes no Amazonas e Rio de Janeiro, respectivamente, a 21,3 por 100 mil

habitantes em Goiás (BRASIL, 2002; RUFFINO-NETO, 2001, RUFFINO-NETO, 2002) (TABELA 2 e 3).

Em 2001, foram notificados 71.060 casos novos de tuberculose (todas as formas), sendo 33.250 no Sudeste, 22.057 no Nordeste, 8.253 no Sul, 5.159 no Norte e 2.341 no Centro-Oeste. Dentre as formas extrapulmonares, 39% dos casos foram de tuberculose pleural, 22% de tuberculose ganglionar, 6% de tuberculose miliar, 5% de tuberculose óssea, 4% de tuberculose geniturinária, 5% de meningite tuberculosa, 2% de tuberculose ocular e 17% de outras formas de tuberculose (BRASIL, 2003) (GRÁFICO 1).

**TABELA 2 – Distribuição de casos de tuberculose notificados no Brasil em 1999**

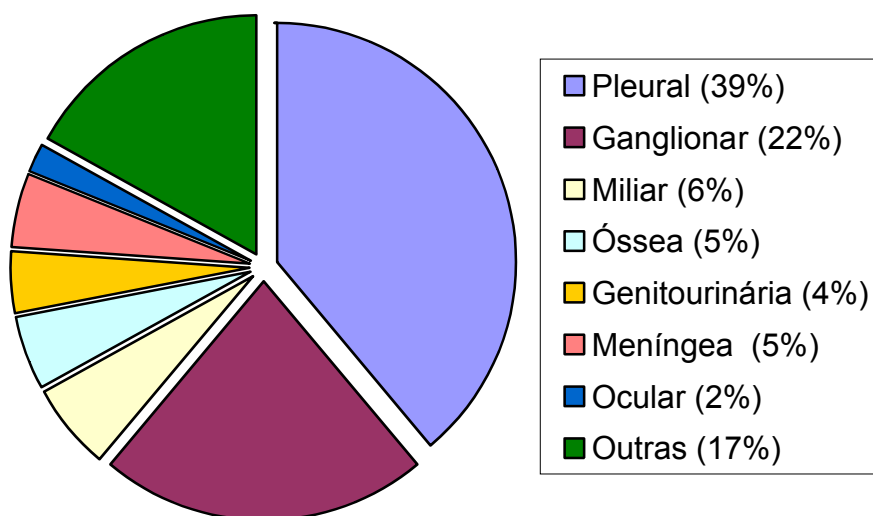
Unidades federadas	Pulmonar		Extrapulmonar	Todas as formas	População
	Bacilífera	/ Total			
<b>Brasil</b>	<b>41.343</b>	<b>66.307</b>	<b>12.153</b>	<b>78.628</b>	<b>163.947.554</b>
<b>Região Norte</b>	<b>4.216</b>	<b>5.668</b>	<b>812</b>	<b>6.480</b>	<b>12.133.705</b>
Rondônia	331	499	59	558	1.296.856
Acre	238	354	23	377	527.937
Amazonas	1.288	1.783	351	2.134	2.580.960
Roraima	103	175	24	199	266.922
Pará	1.957	2.423	305	2.728	5.886.454
Amapá	134	178	30	208	439.781
Tocantins	165	256	20	276	1.134.895
<b>Região Nordeste</b>	<b>12.295</b>	<b>20.644</b>	<b>2.544</b>	<b>23.356</b>	<b>46.289.042</b>
Maranhão	1.361	2.613	148	2.929	5.418.349
Piauí	719	1.111	212	1.323	2.734.152
<b>Ceará</b>	<b>2.229</b>	<b>3.245</b>	<b>333</b>	<b>3.578</b>	<b>7.106.605</b>
Rio G. do Norte	570	993	122	1.115	2.654.501
Paraíba	667	1.174	148	1.322	3.375.609
Pernambuco	1.767	3.157	444	3.601	7.580.826
Alagoas	627	942	156	1.098	2.713.203
Sergipe	340	520	76	596	1.712.786
Bahia	4.015	6.889	905	7.795	12.993.011
<b>Região Sudeste</b>	<b>18.132</b>	<b>29.576</b>	<b>6.329</b>	<b>35.905</b>	<b>69.858.115</b>
Minas Gerais	3.046	4.251	1.085	5.336	17.295.955
Espírito Santo	885	1.148	240	1.388	2.938.062
Rio de Janeiro	5.224	8.944	1.835	10.779	13.807.358
São Paulo	8.977	15.233	3.169	18.402	35.816.740
<b>Região Sul</b>	<b>4.848</b>	<b>7.239</b>	<b>1.864</b>	<b>9.103</b>	<b>24.445.950</b>
Paraná	1.384	2.261	501	2.762	9.375.592
Santa Catarina	770	1.201	324	1.525	5.098.448
Rio G. do Sul	2.694	3.777	1.039	4.816	9.971.910
<b>Centro-Oeste</b>	<b>1.943</b>	<b>3.180</b>	<b>604</b>	<b>3.784</b>	<b>11.220.742</b>
Mato G. do Sul	439	771	145	916	2.026.600
Mato Grosso	601	1.068	124	1.192	2.375.549
Goiás	615	846	188	1.034	4.848.725
Distrito Federal	288	495	147	642	1.969.868

Fonte: Brasil 2003.

**TABELA 3 – Coeficiente de incidência de tuberculose no Brasil em 1999**

Unidades federadas	Coeficientes de incidência por 100.000 habitantes			
	Bacilífera	Pulmonar	Extrapulmonar	Todas as formas
<b>Brasil</b>	<b>25,3</b>	<b>40,4</b>	<b>7,4</b>	<b>48,0</b>
<b>Região Norte</b>	<b>34,7</b>	<b>46,7</b>	<b>46,7</b>	<b>53,4</b>
Rondônia	25,5	38,5	4,5	43,0
Acre	45,1	67,1	4,4	71,4
Amazonas	49,9	69,1	13,6	82,7
Roraima	38,6	65,6	9,0	74,6
Pará	33,2	41,2	5,2	46,3
Amapá	30,5	40,5	6,8	47,3
Tocantins	14,5	22,6	1,8	24,3
<b>Região Nordeste</b>	<b>26,6</b>	<b>44,6</b>	<b>5,5</b>	<b>50,5</b>
Maranhão	25,1	48,2	2,7	54,1
Piauí	26,3	40,6	7,8	48,4
<b>Ceará</b>	<b>31,4</b>	<b>45,7</b>	<b>4,7</b>	<b>50,3</b>
Rio G. do Norte	21,5	37,4	4,6	42,0
Paraíba	19,8	34,8	4,4	39,2
Pernambuco	23,3	41,6	5,9	47,5
Alagoas	23,1	34,7	5,7	40,5
Sergipe	19,9	30,4	4,4	34,8
Bahia	30,9	53,0	7,0	60,0
<b>Região Sudeste</b>	<b>26,0</b>	<b>42,3</b>	<b>9,1</b>	<b>51,4</b>
Minas Gerais	17,6	24,6	6,3	30,9
Espírito Santo	30,1	39,1	8,2	47,2
Rio de Janeiro	37,8	64,8	13,3	78,1
São Paulo	25,1	42,5	8,8	51,4
<b>Região Sul</b>	<b>19,8</b>	<b>29,6</b>	<b>7,6</b>	<b>37,2</b>
Paraná	14,8	24,1	5,3	29,5
Santa Catarina	15,1	23,6	6,4	29,9
Rio G. do Sul	27,0	37,9	10,4	48,3
<b>Centro-Oeste</b>	<b>17,3</b>	<b>28,3</b>	<b>5,4</b>	<b>33,7</b>
Mato G. Do Sul	21,7	38,0	7,2	45,2
Mato Grosso	25,3	45,0	5,2	50,2
Goiás	12,7	17,4	3,9	21,3
Distrito Federal	14,6	25,1	7,5	32,6

Fonte: Brasil 2003.

**GRÁFICO 1** - Distribuição da tuberculose extrapulmonar no Brasil em 2001

Fonte: Brasil 2003.

### 2.2.3 A tuberculose no Ceará

No Ceará, os dados de 1995 a 1999 revelam a ocorrência da média anual de 4.297 casos novos. De 2000 a 2002, a média anual diminuiu para 3.486 casos novos. Em 2002, foram notificados 3.711 casos novos, sendo que 3.430 foram formas pulmonares e 281 extrapulmonares. Dentre as formas extrapulmonares, 88 casos foram de tuberculose pleural, 60 de gânglio periférico, 19 genitourinária, 35 óssea, 9 ocular, 21 miliar, 12 de meningite tuberculosa e 37 casos de outras formas de tuberculose (CEARÁ, 2003).

### 2.3 Agente etiológico

As micobactérias estão posicionadas taxonomicamente na Ordem *Actinomycetales*, Família *Mycobacteriaceae*, sendo o *Mycobacterium tuberculosis* a espécie-tipo do Gênero *Mycobacterium*. O *Mycobacterium tuberculosis* é uma forma de transição entre as eubactérias e os actinomicetos. É um bacilo não flagelado, não esporulado, não encapsulado, não produtor de toxinas, aeróbio estrito e parasita intracelular facultativo (é capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior de

células fagocitárias). Mede de 1 a 4 micrômetros de comprimento por 0,3 a 0,6 micrômetros de diâmetro. Possui longo período de duplicação (18 a 48 horas), dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio. Em razão do alto conteúdo lipídico da sua parede celular, que pode atingir até 40% do peso seco das células, o bacilo é protegido da ação de agentes químicos, embora seja facilmente destruído por agentes físicos, como o calor, raios ultravioleta e irradiações ionizantes.

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é constituído de várias espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. O agente mais freqüente na tuberculose humana é o próprio *M. tuberculosis* (BRASIL, 1994; MURRAY *et al.*, 1998; KRITSKI *et al.*, 2000).

A caracterização etiológica da tuberculose é de suma importância no desfecho diagnóstico e a evolução nos métodos diagnósticos (TABELA 5) nos proporciona atualmente a possibilidade do emprego de métodos cada vez mais sensíveis, específicos e rápidos (KRONBAUER *et al.*, 1996).

**TABELA 4** - Histórico da evolução dos métodos diagnósticos micobacteriológicos

---

1882	Koch apresentou evidências laboratoriais da etiologia da tuberculose
1883	Ziehl-Neelsen desenvolveram a técnica de coloração do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR)
1915	Kinyoun modificou a técnica de coloração de BAAR
1932	Lowenstein-Jensen desenvolveram o meio para crescimento do bacilo
1956	Teste da Niacina
1959	Sistema de classificação de Runyon
1962	Fluorescência de auramina-rodamina
1963	Teste microbiológico para sensibilidade a drogas
1977	Cromatografia gás-líquido para identificação
1980	BACTEC® usado para detecção de micobactérias
1981	BACTEC® usado para teste de sensibilidade a drogas
1983	BACTEC® (Teste do Fosfato do Ácido Nucléico) usado para identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i>
1984	Cromatografia líquida de alta resolução para identificação
1987	Desenvolvimento de sonda genética isotópica
1988	Identificação de micobactéria diretamente do espécime clínico, usando sondas genéticas
1989	Avaliação de sondas genéticas não isotópicas; desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR)
1992	Identificação da micobactéria diretamente do espécime clínico usando PCR

---

Fonte: KRONBAUER *et al.*, 1996.

## 2.4 Avaliação clínica da tuberculose pulmonar

Um problema grave para o controle da tuberculose pulmonar é a demora no diagnóstico da doença; estima-se que para cada caso com baciloscopia positiva dois ou três contatos irão infectar-se antes da detecção (RAVIGLIONE *et al.*, 1998). O quadro clínico do paciente com tuberculose pulmonar (tosse com expectoração por três ou mais semanas, febre, calafrios, sudorese noturna, perda de peso,

anorexia e hemoptise) pode ser confundido com outras condições pulmonares subagudas e crônicas, tanto infecciosas como não infecciosas. A doença, entretanto, mesmo em estado avançado, é curável, devendo o paciente seguir o tratamento adequado. O tempo de terapia ainda é prolongado, sendo suficientes seis meses para a maioria dos casos, no entanto bem mais curto do que no passado, quando consumia até dezoito meses (FIÚZA DE MELO *et al.*, 1996).

A infecção primária quase sempre é subclínica, não passível de detecção pelos procedimentos radiológicos comuns, passando despercebida no paciente imunocompetente. O mais comum é que haja apenas um foco pulmonar, embora não sejam raros os casos de focos múltiplos. A infecção primária, contudo, pode ser diagnosticada por uma conversão no teste cutâneo da tuberculina (WOLINSKY, 1993). A reação inflamatória desencadeada pela infecção primária leva comumente à calcificação do foco, originando um nódulo quase sempre com dimensões próximas às de uma ervilha, que recebe o nome de nódulo de Ghon. Geralmente, o foco da infecção primária regride com a cura espontânea da lesão. Não raro, entretanto, permanecem bacilos vivos no interior do nódulo remanescente, em estado latente. Esses bacilos podem permanecer inativos durante toda a vida do indivíduo ou reativar-se na vigência de condições que sejam favoráveis para seu desenvolvimento (CAMPOS, 1991; LEITE *et al.*, 1997; FIUZA DE MELO, 1996).

A infecção secundária geralmente resulta de uma reativação endógena, ou seja, ocorre reativação de focos latentes nas porções posteriores dos lobos superiores que foram “semeados” por via hematogênica durante a fase primária da doença. Nos casos de reinfeção exógena, a infecção secundária resulta de uma nova inoculação de bacilos em uma pessoa já sensibilizada por uma infecção prévia. A infecção secundária se caracteriza pela cronicidade, caseificação, eliminação de material caseoso liquefeito, formação de cavidade e ocorrência simultânea de cicatrização e progressão em diferentes áreas do pulmão (WOLINSKY, 1993).

A reativação ocorre com maior freqüência nas situações de vida em que as defesas orgânicas se debilitam. Algumas das circunstâncias que podem dar ensejo ao desenvolvimento da tuberculose é o alcoolismo, bem como e as diferentes formas de desnutrição. A imunossupressão também favorece o aparecimento da tuberculose, seja em decorrência de tratamentos medicamentosos, da AIDS, de neoplasias ou condições debilitantes outras. A lenta redução da imunidade que

acompanha o envelhecimento também pode favorecer o desenvolvimento da doença em idades avançadas (LEITE *et al.*, 1997; FIÚZA DE MELO, 1996).

A tendência de queda nos índices da tuberculose pulmonar, em nenhum momento é acompanhada pela tuberculose extrapulmonar. Nessa última, há uma tendência de constância, pois, na maioria dos casos, os focos extrapulmonares são reservatórios até então latentes em pacientes infectados no passado (AMATO *et al.*, 2003).

A chave para o diagnóstico da tuberculose é um alto índice de suspeição e a pronta utilização de métodos diagnósticos apropriados. A abordagem para o diagnóstico depende dos critérios de reconhecimento dos seguintes itens: a) agente infeccioso (com ou sem concentração dos bacilos), e/ou b) produtos micobacterianos (detecção de antígenos ou metabólitos), e/ou c) resposta do hospedeiro (detecção de alterações anatômicas e/ou anticorpos contra micobactérias) (TABELA 6) (SEVERO, 1993; KRONBAUER *et al.*, 1996).

#### **TABELA 5 - Métodos diagnósticos**

---

##### Identificação da presença do microorganismo

Exame direto do escarro (em microscópio comum ou fluorescente)

Isolamento em cultura (convencional ou rápido - BACTEC®)

Exame de imunofluorescência

Exame do crescimento em cultura com detecção de antígeno por imunoensaio

Detecção do ácido tuberculoesteárico

Detecção de cadeias específicas de DNA e RNA

##### Identificação da resposta do hospedeiro

Sorologia

Histopatologia

Radiologia do tórax

Teste tuberculínico

---

Fonte: KRONBAUER *et al.*, 1996.

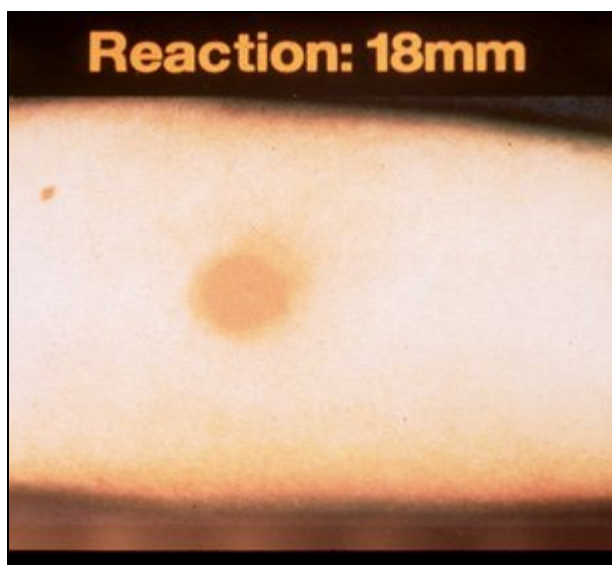
### 2.4.1 Teste de sensibilidade à tuberculina (Teste de Mantoux)

Após duas a dez semanas da infecção pelo *M. tuberculosis*, os linfócitos T se tornam sensibilizados a componentes do bacilo. Em razão desta memória imunológica por linfócitos T, a reexposição às estruturas antigênicas do bacilo permite que haja sua ativação e, conseqüentemente, sua expressão. Assim, a introdução de proteínas do *M. tuberculosis* na pele do infectado enseja uma resposta inflamatória caracterizada por infiltrado de histiócitos e linfócitos T, que atinge o seu pico em 48 a 72 horas após a sua administração, caracterizando a resposta de hipersensibilidade tardia. A resposta de hipersensibilidade tardia é expressa clinicamente pelo aparecimento de vasodilatação e edema.

Utiliza-se para o teste tuberculínico a Técnica de Mantoux, que consiste na injeção intradérmica de antígenos do *M. tuberculosis*, convencionalmente na face ventral do antebraço esquerdo. No Brasil, o teste tuberculínico é realizado aplicando-se 0,1 mililitro do derivado protéico purificado (PPD-Rt23), equivalente a duas unidades tuberculínicas (UT).

A leitura da prova tuberculínica é realizada de 48 a 72 horas após a aplicação e a resposta ao teste é classificada segundo o tamanho da zona de endurecimento e tem a seguinte interpretação:

- ❖ 0 a 4mm - não reator, indivíduo não infectado pelo *M. tuberculosis* ou com contato recente (< 2 semanas) com hipersensibilidade reduzida;
- ❖ 5 a 9mm - reator fraco, indivíduo vacinado com BCG, infectado pelo *M. tuberculosis* ou por outras micobactérias; e
- ❖ igual ou maior que 10mm - reator forte, indivíduo infectado pelo *M. tuberculosis*, doente ou não, e indivíduos vacinados com BCG nos últimos dois anos.



**FIGURA 1:** Teste de Mantoux em um paciente reator forte.

Fonte: OMS / WHO Report – 2002

Em países com prevalência significativa de tuberculose, a taxa de infecção dos habitantes é alta. No Brasil ela está entre 30% e 40%. Além disso, a vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin), no Brasil alcança cobertura maior do que 95%, torna o indivíduo reator ao teste. Estas razões explicam o grande número de testes positivos ou reagentes em indivíduos não-doentes (AFIUNE, 1996; SOLÉ, 2002, BRASIL, 2002).

#### **2.4.2 Radiografia de tórax**

Aos raios X, verificam-se nos pulmões áreas rádio-opacas anormais cuja aparência e localização apresentam-se indicativas da doença. Na tuberculose primária, aparecem áreas finas de infiltração, com aumento dos linfonodos na região baixa e central dos pulmões. Na tuberculose secundária, observam-se infiltração intensa na região superior dos pulmões e brônquios, bem como tubérculos marcantes (REQUEJO, 2001)

## 2.5 Tuberculose extrapulmonar

No Brasil, aproximadamente 85% dos casos notificados são de tuberculose pulmonar e o restante de casos extrapulmonares (TEP - tuberculose extrapulmonar). As localizações mais comuns para TEP no País são, em ordem decrescente: pleural, linfática, geniturinária e osteoarticular. Outros órgãos e tecidos também podem ser afetados pela tuberculose, como meninges, pericárdio, laringe, pele, peritônio e cérebro.

São quatro as vias pelas quais os sítios extrapulmonares podem ser acometidos:

- via linfo-hematogênica - responsável pela maioria das formas extrapulmonares da doença (tuberculose ganglionar, renal, adrenal, óssea, meningoencefálica, ganglionar intra-abdominal e genital feminina);
- via hematogênica - quando há ruptura da lesão diretamente no vaso, podendo ocasionar formas disseminadas agudas da doença;
- por contigüidade - responsável pelas formas pleural a partir do pulmão; pericárdica, a partir dos gânglios mediastinais; peritoneal, a partir dos gânglios mesentéricos, alças intestinais ou trompas e algumas formas de tuberculose cutânea periorifical, a partir de focos ósseos; e
- intracanalicular: comprometimento de vias aéreas altas, a partir do pulmão; trato urinário inferior e sistema genital masculino, a partir do rim; endométrio e peritônio, a partir das trompas.

A maioria das formas de TEP acontece em órgãos sem condições ótimas de crescimento bacilar. Dessa forma, a TEP será quase sempre pobre em bacilos, de instalação insidiosa e de evolução mais lenta. O tempo de latência entre a infecção e as manifestações clínicas da doença, geralmente, é muito longo, podendo chegar, por exemplo, para a tuberculose renal, a mais de vinte anos. As manifestações clínicas são bem menos freqüentes do que na tuberculose pulmonar, exceto nas formas disseminadas da doença. A sintomatologia específica dependerá do órgão e/ou sistema comprometido e é determinada por fenômenos inflamatórios

ou obstrutivos (CORRÊA DA SILVA, 1993; FIÚZA DE MELO *et al.*, 1993; AFIUNE, 1996; LEITE *et al.*, 1997).

As formas extrapulmonares podem ser divididas em dois grupos: as que ocorrem precocemente (até um ano após a primo-infecção) e as que sucedem tardiamente (após este intervalo). As formas serosas (pleura, pericárdio, peritônio e meninges) costumam ser precoces. As formas pleural e pericárdica podem também ocorrer a partir de um foco pulmonar contíguo. As formas tardias mais freqüentes são a ganglionar e a do trato geniturinário (KRITSKI *et al.*, 2000).

### 2.5.1 Tuberculose pleural

É a forma mais comum de TEP em nosso meio. A positividade à baciloscopia é extremamente baixa e a cultura é positiva apenas em cerca de 12 a 25% dos casos. A determinação da atividade da adenosinadeaminase (ADA) no líquido pleural mostra-se particularmente útil no diagnóstico da tuberculose pleural (AFIUNE, 1996; KRITSKI *et al.*, 2000).

A adenosinadeaminase (ADA) é uma enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de adenosina em inosina e amônia. Observou-se sua importância na maturação de macrófagos e monócitos e na diferenciação de células linfóides, particularmente das células T. A diferenciação molecular da ADA permitiu a descoberta de duas isoenzimas: ADA1 e ADA2. A ADA está elevada na lise celular (ADA1) e na presença de microrganismos vivos no interior dos macrófagos (ADA2). Então, quando a ADA2 está elevada, a suspeita diagnóstica recai sobre uma doença infecciosa. No Brasil, o primeiro diagnóstico a ser aventado é o de tuberculose, principalmente quando os níveis de ADA no líquido pleural são iguais ou superiores a 40U/L (CESTARI FILHO *et al.*, 1987; ALVES *et al.*, 1994; MARTIRE, 2002; AMATO *et al.*, 2003).

Embora sem especificidade absoluta, a avaliação da atividade da ADA, associada a dados como idade, quadro clínico, PPD, além de outras características do líquido pleural, mostrou excelente correlação com o padrão-ouro no diagnóstico de tuberculose pleural. Tratando-se de um método colorimétrico, a determinação da atividade da enzima é passível de execução em laboratórios sem grande aparato

tecnológico (CESTARI FILHO *et al.*, 1987; AFIUNE *et al.*, 1990; KRITSKI *et al.*, 2000).

### **2.5.2 Tuberculose pericárdica**

O envolvimento tuberculoso do pericárdio é uma forma rara de tuberculose e apresenta-se mais freqüentemente como derrame pericárdico de evolução crônica. A pesquisa direta de BAAR é geralmente negativa, enquanto a cultura apresenta rendimento maior, em aproximadamente 40% dos casos, mas não auxilia na tomada imediata de uma decisão terapêutica. Atualmente, com a introdução de métodos rápidos de cultivo, pode-se reduzir o tempo de espera do resultado desse exame (TARASCONI *et al.*, 1993).

### **2.5.3 Tuberculose peritoneal**

Os sintomas e sinais da localização peritoneal da tuberculose são de início insidiosos e inespecíficos. A peritonite tuberculosa deve ser suspeitada em qualquer paciente com ascite, febre, dor abdominal difusa e sintomas constitucionais não explicados. O diagnóstico pode ser obtido pelo achado do bacilo no líquido ascítico, por intermédio de pesquisa direta ou cultura. No primeiro, o resultado é geralmente negativo, sendo encontrado o BAAR em menos de 5% dos pacientes. A cultura, comumente negativa nos exames de rotina, pode resultar positiva em até 80% dos casos, quando utilizados mais de 1.000 mL de líquido para exame (ALVES *et al.*, 1993; HAAS *et al.*, 2002).

A dosagem da ADA pode ser usada como teste de triagem no diagnóstico diferencial das ascites. Valores de ADA acima de 31U/L indicam a necessidade de testes invasivos (laparoscopia e/ou biopse peritoneal) para confirmação diagnóstica (BRANT *et al.*, 1995).

#### 2.5.4 Meningite tuberculosa

A meningite tuberculosa resulta de uma lesão ativa do sistema nervoso central pela disseminação dos bacilos e é a mais grave forma de TEP, podendo causar retardo mental permanente, cegueira e ser fatal dentro de 4 a 8 semanas, em 30 a 50% dos casos. Na forma meningoencefálica, a bacterioscopia geralmente é negativa e a cultura, embora mais sensível, permite o isolamento do bacilo em não mais do que 15% dos casos. Além disso, a demora para o resultado da cultura praticamente invalida a utilização do método para a decisão sobre o início da terapêutica. No líquido cefalorraquidiano, a dosagem da ADA é fundamental na tentativa de diferenciação entre as várias etiologias de meningite linfomonocitária. Nas meningites de etiologia tuberculosa, o valor discriminativo da ADA no líquido cefalorraquidiano é de 15U/L (RIBERA *et al.*, 1987; AFIUNE *et al.*, 1990; ALVES *et al.*, 1994; AFIUNE, 1996; REQUEJO, 2001).

Antígenos micobacterianos também podem ser detectados no líquido dos pacientes com meningite tuberculosa através dos métodos de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, teste de imunoadsorção ligado à enzima ou ensaio imunoenzimático) ou radioimunoensaio. A sensibilidade destes ensaios varia entre 39% e 79% e a especificidade entre 98% e 100% (ALVES *et al.*, 1994).

A sorologia pode ser de grande importância no diagnóstico da tuberculose, principalmente nos casos em que os métodos diagnósticos tradicionais são falhos (baciloscopia negativa, nas formas extrapulmonares e em todas as formas na criança) (BOTHAMLEY *apud* FERREIRA, 1997).

A sorologia para tuberculose é feita pelo método ELISA. A sorologia pode ser realizada com antígenos brutos, antígenos semipurificados (como o PPD, preparados com base em culturas de *M. tuberculosis*) e antígenos altamente purificados extraídos do *M. tuberculosis* (KRITSKI *et al.*, 2000).

O método de ELISA não requer instrumentos sofisticados e utiliza reagentes de baixo custo, podendo, por isso, ser facilmente empregada nos países periféricos. No caso da tuberculose, entretanto, os resultados obtidos com o método, embora promissores, não são definitivos (SEVERO, 1993), pois ainda permanece a necessidade de que o teste ofereça uma especificidade próxima de 100%. O *M.*

*tuberculosis* compartilha estruturas antigênicas com outras espécies de micobactérias ambientais não patogênicas e repetidos contatos com estes acarretariam algum grau de sensibilização na população, levando assim a níveis elevados de anticorpos entre indivíduos sadios (FERREIRA *et al.*, 1997).

No momento, os estudos buscam determinar frações antigênicas do *M. tuberculosis* e definir o nível sérico distintivo entre infecção e doença. Presume-se que seja necessária a utilização de antígenos específicos para cada espécie de micobactérias (DANIEL, 1989; WATT *et al.*, 1988; WILKINS *et al.*, 1990).

### **2.5.5 Tuberculose osteoarticular**

Os ossos mais comprometidos são as vértebras, seguidas das epífises dos ossos longos. O joelho e o quadril são as articulações preferencialmente afetadas. A bacteriologia do líquido sinovial revela positividade em aproximadamente 20% para a baciloscopia direta e perto de 90% para cultura do líquido sinovial (OLIVEIRA *et al.*, 1981; AFIUNE, 1996).

### **2.5.6 Outras formas de tuberculose extrapulmonar**

A tuberculose cutânea é rara, e geralmente corresponde à propagação de um foco contíguo ou à inoculação traumática da pele com material contaminado. Em vista da potencialidade da pele em reagir de formas diferentes a um mesmo agente, e da variação de virulência do bacilo, a tuberculose cutânea pode expressar-se clinicamente por meio de inúmeras formas de lesões elementares, como úlceras, vegetações, nódulos, tumores ou infiltrados cicatriciais. De acordo com a lesão, o diagnóstico pode ser confirmado pela pesquisa direta do bacilo na lesão (baciloscopia ou cultura) ou mediante de exame histopatológico de fragmentos de biopsia (GUTIERREZ *et al.*, 1993).

A tuberculose pode também comprometer a laringe, boca, faringe e ouvido médio, em decorrência da evolução tardia de focos de disseminação linfo-hematogênica da primoinfecção. Para todo paciente com tuberculose que apresentar manifestações clínicas de comprometimento de algum destes órgãos, indica-se a

realização de baciloscopia e cultura em material obtido de raspado das lesões e, se necessário, exame histopatológico de fragmentos de biopsia (PICON *et al.*, 1993).

A tuberculose oftálmica pode ocorrer por inoculação direta do bacilo na conjuntiva ou por uma reação de hipersensibilidade a presença do bacilo no organismo. A fundoscopia apresenta um aspecto granulomatoso e o teste tuberculínico é geralmente positivo. O diagnóstico é geralmente feito com suporte da boa resposta clínica ao uso do esquema terapêutico para tuberculose, após oito semanas de uso (KRITSKI *et al.*, 2000).

## **2.6 Diagnóstico bacteriológico da tuberculose**

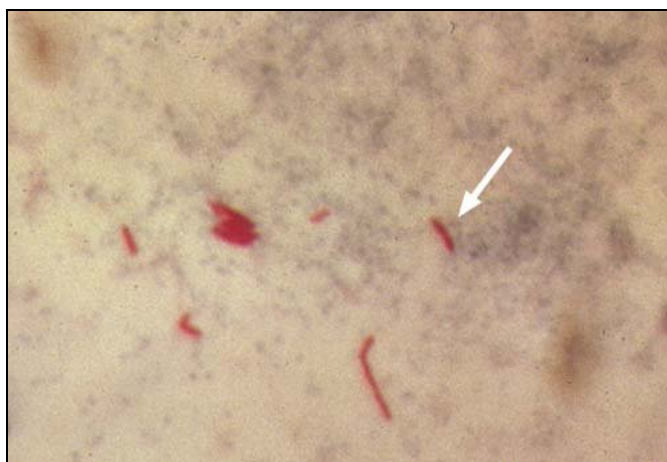
Os métodos bacteriológicos (baciloscopia e cultura) ainda são prioritários para o diagnóstico da tuberculose, pois permitem a demonstração do bacilo, estabelecendo a etiologia da doença.

### **2.6.1 Baciloscopia**

O exame microscópico do esfregaço de escarro é provavelmente o diagnóstico mais eficiente para a confirmação de tuberculose pulmonar. Por ser de execução rápida, simples e de baixo custo, favorece ampla cobertura de diagnóstico, identificando a principal fonte de infecção, os doentes bacilíferos, permitindo a pronta atuação na interrupção da cadeia de transmissão. A baciloscopia é útil no acompanhamento da eficácia do tratamento, por meio da redução bacilar até a negatificação do escarro, realizado em exames mensais ou enquanto o paciente estiver expectorando. Nesta técnica, emprega-se a coloração de Ziehl-Neelsen, onde o bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) cora-se em vermelho pela fucsina fenicada, em contraste com uma coloração de fundo de azul de metileno. O resultado da baciloscopia deve ser informado em número de cruces segundo a escala semi-quantitativa padronizada pela Organização Mundial da Saúde, demonstrada na tabela seguinte. (BRASIL, 1994; KONEMAN *et al.*, 1993; NOGUEIRA *et al.*, 2000; OPLUSTIL *et al.*, 2000).

**TABELA 6** - Escala semi-quantitativa padronizada pela Organização Mundial da Saúde

(-) Não foram encontrados BAAR em 100 campos observados
(+) Presença de menos de 1 BAAR por campo em 100 campos observados
(++) Presença de 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos observados
(+++) Presença de mais de 10 BAAR por campo em 20 campos observados



**FIGURA 2:** Bacilo álcool-ácido resistente (BAAR)

Fonte: WHO Report - 2002

Para obter um resultado positivo na baciloscopia, entretanto, são necessários pelo menos 5.000 a 10.000 bacilos por mililitros de escarro e, portanto, um resultado negativo na baciloscopia não é certeza da ausência de tuberculose (BRASIL, 1994).

A sensibilidade da baciloscopia deixa a desejar porque envolve vários fatores sociológicos, epidemiológicos e operacionais, podendo ser negativa em cerca de 30% dos pacientes com tuberculose pulmonar. Já a especificidade desse método é muito alta, apesar de outros BAAR falsearem o resultado, principalmente em imunodeprimidos, necessitando a identificação da espécie do BAAR encontrado (KRONBAUER *et al.*, 1996).

Outras desvantagens da baciloscopia são: a) a técnica evidencia a presença de BAAR (bacilo álcool-ácido resistente), não especificando a espécie do gênero *Mycobacterium*; b) a técnica é pouco eficaz em casos de tuberculose extrapulmonar, quando o *Mycobacterium* não é visualizado com frequência; e c) a presença de BAAR não indica a viabilidade do bacilo (BRASIL, 1994).

### 2.6.2 Cultura

A cultura é a metodologia mais sensível (padrão-ouro) e pode detectar a presença do *M. tuberculosis* a partir de 10 a 100 bacilos viáveis por mililitro de amostra. O isolamento das micobactérias em meio de cultura é o método bacteriológico mais sensível e específico disponível até o momento para o diagnóstico de tuberculose pulmonar, principalmente nos casos iniciais, em que a baciloscopia pode ser negativa, no diagnóstico de tuberculose extrapulmonar e no diagnóstico diferencial de outras doenças. O cultivo possibilita ainda a posterior identificação da micobactéria, assim como a realização do teste de sensibilidade às drogas micobactericidas, o que não é possível quando se realiza somente a baciloscopia (BRASIL, 1994; NOGUEIRA *et al.*, 2000).



**FIGURA 3:** Colônia de *Mycobacterium tuberculosis*

Fonte: OMS / WHO Report – 2002

Como o *M. tuberculosis* tem um tempo de geração de cerca de 18h no meio de Lowenstein-Jensen (meio sólido à base de ovo), é necessário um período de incubação de 18 a 28 dias para se ter uma cultura positiva e até 40 dias de incubação para considerá-la negativa. Trata-se de um período excessivamente longo para concluir o diagnóstico de uma doença altamente transmissível e que rapidamente pode evoluir para uma forma grave de tuberculose nos pacientes imunodeprimidos (BRASIL, 1994).

### 2.6.3 Métodos rápidos de detecção de cultivos automatizados

Outros meios de cultura à base de ágar estão disponíveis comercialmente, sendo os mais usados Middlebrook 7H10 e o 7H11. O rendimento dos diversos meios, tanto à base de ágar como de ovo, é similar. O esquema de isolamento primário pode incluir um meio líquido, especialmente quando sabemos que o material clínico é paucibacilar; nesse caso, o mais usado é o meio líquido Middlebrook 7H9.

Existem métodos de verificação indireta do crescimento em cultura do *M.tuberculosis*, baseados na detecção da produção de CO<sub>2</sub> ou no consumo de O<sub>2</sub>. Entre os métodos baseados na produção de CO<sub>2</sub>, há o sistema BACTEC 460TB (Becton Dickinson, Sparks, Md), que detecta o crescimento de micobactérias em meio líquido seletivo. O sistema BACTEC, o qual é um método de detecção radiométrico, utiliza o meio líquido Middlebrook 7H12, acrescido de ácido palmítico, marcado com radioisótopo carbono 14 [14C]. Quando ocorre crescimento bacilar, o bacilo metaboliza o ácido palmítico, liberando <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Este <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> radioativo é detectado pelo equipamento BACTEC, indicando que houve crescimento bacteriano. Nesse sistema, o tempo para detecção do crescimento bacilar é encurtado em cerca de dez dias, quando comparado com os métodos tradicionais. O sistema BACTEC também pode ser utilizado para hemocultura, testes de sensibilidade e identificação de micobactérias.

Outro método, MB BacT system (Organon, Teknica, Turnhout, Bélgica), detecta a produção de CO<sub>2</sub> por monitoramento contínuo mediante um sistema de sensores ópticos e não por emissão de carbono marcado.

Entre os métodos de cultura para micobactérias baseados na detecção do consumo de O<sub>2</sub>, encontram-se o Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT - Becton Dickison, Sparks, Md) e o BACTEC 9000 (Becton Dickison, Sparks, Md). Estes métodos utilizam um tubo de ensaio contendo meio líquido, onde existe uma base de silicone impregnada com rutênio, metal que emite luminescência na ausência de O<sub>2</sub>. Se há crescimento bacteriano, há também consumo de O<sub>2</sub> e o rutênio emitirá luminescência, possível de ser detectada com luz ultravioleta. O resultado é obtido num tempo mais curto do que a cultura convencional e pode-se também realizar teste de sensibilidade (KRONBAUER *et al.*, 1996; OPLUSTIL *et al.*, 1997; NAVA *et al.*, 2001).

## 2.7 Micobactérias não tuberculosas (MNTB)

Após a descoberta do *Mycobacterium tuberculosis* em 1882 e do *Mycobacterium bovis* em 1898, foram isoladas inúmeras outras micobactérias da água, do solo, de animais e de secreções naturais humanas. Estas outras micobactérias, que apresentavam características laboratoriais distintas e não eram patogênicas em ensaios com cobaias, receberam as seguintes denominações: “bacilos pseudotuberculosos”, por Moeller em 1899; “bacilos paratuberculosos”, por Borrel e Marmoreck em 1901 (RIZZON *et al.*, 1993).

Posteriormente, com a difusão da prática da cultura de bactérias baseada em amostras clínicas na rotina laboratorial, foi possível isolar as novas micobactérias em tecidos humanos, levando Timpe e Runyon ao reconhecimento da patogenicidade destas para o homem, em 1954. Esses autores empregaram a expressão “micobactérias atípicas”, sendo que outras denominações foram sugeridas ao longo do tempo; “micobactérias anormais”, por parte de Hauduroy em 1955; “micobactérias anônimas”, por meio de Runyon em 1959; “micobactérias não classificadas” por Corpe Runyon e Lester em 1963; MOTT (*Mycobacterium other than tuberculosis bacilli*), por Matheus em 1963; “micobactérias oportunistas”, por Marks e Selkon em 1969; “micobactérias não tuberculosas”, por Wolinsky em 1979; PPEM (Potentially pathogenic environmental mycobacteria); “micobactérias não tuberculosas” (MNTB), pela Sociedade Americana do Tórax (ATS); e Ruiz *et al.*, em

1998, as denominaram “micobactérias ambientais” (FERREIRA, 2001; CASAL, 2003; MORRONE *et al.*, 2003).

Entende-se por micobacterioses as infecções causadas por micobactérias, excluindo-se o complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*, que normalmente habitam o meio ambiente e que em certas circunstâncias podem causar doença, muitas vezes lembrando a tuberculose (TIMERMAN, 1993).

Embora as micobacterioses tenham incidência mundial, a sua freqüência difere muito entre os países e as regiões de um mesmo país. Naqueles países com elevados índices de tuberculose, as micobacterioses não se apresentam como objeto de atenção e, por isso, a incidência é desconhecida, como parece ser o caso do Brasil (ANDRADE, 1986).

Anteriormente, as micobacterioses eram raras e quase exclusivas dos pacientes com pneumopatias crônicas, com malignidades hematológicas ou em uso de medicação imunossupressora. Atualmente, com a expansão da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), estas micobacterioses são diagnosticadas mais freqüentemente, em torno de 17 a 30% destes pacientes, atingindo 50%, quando incluídos os casos de necropsia (WOODS, 1999).

Um aspecto importante a ser considerado é a elevada freqüência com que a infecção é causada pelo complexo *M. avium-intracellulare* (MAI ou MAC), que chega a ser responsável por 96% dos casos das micobacterioses. As outras micobactérias, tais como *M. kansasii*, *M. gordonae*, complexo *M. fortuitum-chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. smegmatis*, *M. malmoense*, *M. haemophilum* e *M. genavense* são relatadas mais esporadicamente em casos de micobacterioses (SEVERO, 1993; REQUEJO, 2001; MORRONE *et al.*, 2003).

## **2.8 Diagnóstico bacteriológico das micobactérias não tuberculosas (MNTB)**

Ainda que o diagnóstico presuntivo de tuberculose pulmonar possa ser realizado com suporte na história clínica, sintomas de apresentação, exame físico, evidências radiográficas da doença e presença de bacilos álcool-ácido resistentes no escarro, o diagnóstico definitivo requer o isolamento e a identificação do

microorganismo causal em cultivo. O mesmo ocorre com as várias espécies de micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, que emergiram como patógenos importantes, com diferentes potenciais de produção de doença e, freqüentemente, com perfis singulares de sensibilidade a drogas antimicobacterianas, que devem ser determinadas por provas laboratoriais (KONEMAN *et al.*, 2001).

### 2.8.1 Baciloscopia

As micobactérias não tuberculosas são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) que se assemelham morfológicamente ao bacilo da tuberculose. Nos casos de micobacterioses, a baciloscopia geralmente é negativa, já que as amostras clínicas são paucibacilares. Somente ao fazer o isolamento pela cultura, surge a primeira suspeita de que possa ser uma micobactéria não tuberculosa, em razão de sua morfologia, pigmentação das colônias com ou sem exposição à luz e velocidade de crescimento. O teste tuberculínico ordinariamente é negativo ou fracamente positivo (KONEMAN *et al.*, 1993).

### 2.8.2 Cultura

No final da década de 1950, quando espécies diferentes de *M. tuberculosis* começaram a ser encontradas com maior freqüência na prática médica, Runyon propôs agrupar esses microorganismos “atípicos” segundo sua velocidade de crescimento e produção de pigmentos (TABELA 8).

**TABELA 7** – Esquema de classificação de Runyon (1950)

<b>Esquema de classificação de Runyon</b>
<b>Grupo I – Fotocromogênicas</b>
<b>Grupo II – Escotocromogênicas</b>
<b>Grupo III – Não fotocromogênicas</b>
<b>Grupo IV – De crescimento rápido</b>

Fonte: KONEMAN, 1993.

Posteriormente, segundo a classificação de Runyon, algumas espécies de micobactérias ficaram conhecidas como causadoras de infecções humanas, atuando como patógenos estritos ou potenciais (TABELA 9) (KONEMAN *et al.*, 2001).

**TABELA 8** – Espécies de *Mycobacterium* causadoras de infecções humanas

<b>Espécies de <i>Mycobacterium</i></b>
<b>Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>:</b> <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. microti</i>
<b>Fotocromogênicas:</b> <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M. asiaticum</i>
<b>Escotocromogênicas:</b> <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. celatum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. flavescens</i>
<b>Não-fotocromogênicas:</b> Complexo <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>M. terrae-triviale</i> , <i>M. shimoidae</i>
<b>De crescimento rápido:</b> Complexo <i>M. fortuitum-chelonae</i> , <i>M. thermoresistible</i>

Fonte: KONEMAN, 1993.

Além da fotocromogenicidade, da velocidade de crescimento e das provas de crescimento em presença de agentes inibidores, algumas provas bioquímicas são utilizadas na identificação das micobactérias (TABELA 10) (FERREIRA, 2001).

**TABELA 9** – Provas bioquímicas indicadas para identificação das micobactérias não tuberculosas

<b>Espécie (Grupo)</b>	<b>Provas Bioquímicas</b>
<b>Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	niacina, redução de nitratos a nitritos
<b>Não-fotocromogênicas</b>	catalase a 68°C, redução de nitratos a nitritos, catalase semi-quantitativa a 68°C e hidrólise de Tween-80
<b>Escotocromogênicas</b>	redução de nitratos a nitritos, hidrólise de tween-80, uréase e tolerância a NaCl a 5%
<b>Fotocromogênicas</b>	redução de nitratos a nitritos, hidrólise de Tween-80, catalase semi-quantitativa a 68°C e urease
<b>De crescimento rápido</b>	aril-sulfatase, redução de nitratos a nitritos, captação de ferro, crescimento em ágar MacConkey

Fonte: KONEMAN, 1993.

O crescente aumento no isolamento de outras espécies de *Mycobacterium* desde uma variedade de localizações extrapulmonares (TABELA 11) ressalta a importância do diagnóstico diferencial entre tuberculose e micobacteriose, já que as lesões são de tal modo inespecíficas que o diagnóstico definitivo exige a identificação da espécie (ATS, 1997), e também porque as duas doenças apresentam fundamental diferença em sua epidemiologia, prognóstico e tratamento. O prognóstico das micobacterioses é benigno, mas há casos graves e fatais. É considerado “caso de micobacteriose” qualquer isolamento de MNTB de amostras extrapulmonares estéreis (ANDRADE, 1986; ATS, 1997).

A micobacteriose causada por *M. avium* é a infecção sistêmica mais freqüente em pacientes com SIDA nos EUA, Europa, América Latina e África (INDERLIED *et al.*, 1993; HORSBURGH *et al.*, 2001). No Brasil, esta alta freqüência ainda não foi observada (BARRETO, 1993). *M. avium* e *M. intracellulare*, por terem características de crescimento e reações bioquímicas semelhantes, muitas vezes não são distinguidos no laboratório de Microbiologia Clínica e são descritos como complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) (WOLINSKY, 1993).

Em crianças, o *M. avium* já foi considerado como a principal espécie causadora de linfadenite cervical, sendo identificado em 80% dos casos. Posteriormente, outras micobactérias foram isoladas, como *M. tuberculosis*, *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare* e *M. xenopi* (THIBERT *et al.*, 1990; ATS, 1997).

A micobacteriose causada pelo *M. kansasii* tem incidência muito variável no mundo, e, de acordo com a população estudada, é citada como sendo a primeira ou a segunda micobacteriose mais freqüente, encontrada tanto em imunocompetentes quanto em imunodeprimidos (WOLINSKY, 1992; KANATHUR *et al.*, 2001; de JUAN MATRIN *et al.*, 2002). Além da doença pulmonar (MORRONE *et al.*, 2003), o *M. kansasii* pode causar artrite (BERNARD *et al.*, 1999), osteomielite (MARTINEZ *et al.*, 2000) e infecções cutâneas (RAZAVI *et al.*, 2000).

A infecção por *M. kansasii* pode acometer somente o pulmão ou pode ser disseminada. O isolamento concomitante da micobactéria de sítio pulmonar e extrapulmonar define a infecção como disseminada. A infecção extrapulmonar pode

ocorrer como resultado de inoculação ou por disseminação hematogênica, e, evidentemente, sua evolução é mais grave do que a doença restrita ao pulmão (PAPPALARDO *et al.*, 2004).

Um estudo canadense, realizado de 1989 a 1993, envolvendo 357 pacientes com SIDA e infecção micobacteriana, mostrou que 64% dos isolados de escarro foram positivos para *M. avium-complex* (MAC), 18% foram positivos para *M. tuberculosis* e 17% para *M. kansasii* (MONTESSORI *et al.*, 1996).

*M. marinum* tem sido isolado de lesões de pele em pacientes que tiveram exposição prolongada à água, por lazer ou ocupação profissional (ANG *et al.*, 2000), em casos de bursite (SAADATMAND *et al.*, 1999), artrite e osteomielite (BARTON *et al.*, 1997), após tratamento com corticosteróides (EKEROT *et al.*, 1998; HO *et al.*, 2001) e, mais raramente, em pacientes imunocompetentes (VAZQUEZ *et al.*, 1992).

*M. scrofulaceum* foi reconhecido pela primeira vez como causa de linfadenite cervical em crianças em 1956 (PRISSICK). As manifestações extraganglionares de infecção por *M. scrofulaceum* incluem doença pulmonar (EMLER, 1994), doença disseminada (SANDERS *et al.*, 1995; NUNEZ *et al.*, 2002), osteomielite e outras (PHOA *et al.*, 2000).

A maioria das pessoas infectadas com o complexo *M. fortuitum-chelonae* sofreram alguma lesão penetrante (trauma ou procedimento cirúrgico). Os surtos de infecção por *M. chelonae* foram associados com a administração de vacinas e injeções, uso de hemodialisadores e colocação de válvulas e enxertos (SILVA *et al.*, 1996; ZHIBANG *et al.*, 2002). A doença cutânea é manifestada por celulite localizada, abscessos com drenagem espontânea ou nódulos minimamente dolorosos (KULLAVANIJAYA *et al.*, 2003). A osteomielite é uma complicação ocasional (GOLLWITZER *et al.*, 2004; LAMB *et al.*, 2004).

A utilização de sondas genéticas para a detecção de seqüências específicas de DNA e RNA de micobactérias não tuberculosas, bem como a identificação das espécies de micobactérias diretamente da amostra clínica, são procedidas sem a necessidade de provas bioquímicas e com especificidade de 100%. Geralmente, o diagnóstico das micobacterioses é tardio, em virtude do predomínio de casos de tuberculose na população e das semelhanças clínicas e

radiológicas com esta, bem como da impossibilidade técnica e falta de recursos para a realização de cultura e provas bioquímicas específicas para este diagnóstico, em laboratórios que não sejam os de referência (DANIEL, 1989; CHEMLAL *et al.*, 2003; COOK *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2004).

Recentemente, Copenraet *et al.* (2005) realizaram estudo em 89 crianças imunocompetentes com linfadenite cervical, utilizando a técnica da PCR para o diagnóstico de micobacterioses. A PCR para o gênero *Mycobacterium* foi positiva em 66 amostras. Nas PCR espécie-específicas, a maior prevalência foi do *M. avium* (50 casos), seguida pelo *M. haemophilum* (16 casos). Dos 16 casos em que o *M. haemophilum* foi reconhecido pela PCR como sendo o agente etiológico da linfadenite, houve isolamento em cultura em apenas 9 casos.

Molteni *et al.* (2005) descreveram um caso de infecção pulmonar crônica, em paciente imunocompetente, causada por *M. lentiflavum*, descrito pela primeira vez como uma micobactéria não tuberculosa em 1966, em que todos os procedimentos laboratoriais utilizados (cultura, testes bioquímicos e enzimáticos) para sua identificação falharam, o que foi possível somente com a utilização da PCR. Vale ressaltar que os pesquisadores relataram toda a dificuldade encontrada tanto no diagnóstico clínico, laboratorial quanto no tratamento.

TABELA 10 – Doenças causadas por micobactérias não tuberculosas no homem

Doenças		Espécies comuns	Outras
<b>Doença pulmonar crônica do adulto</b>		Complexo <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. malmoense</i>	<i>M. M. xenopi</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. M. scrofulaceum</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. celatum</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. shimodii</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. smegmatis</i> .
<b>Linfadenite</b>		Complexo <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. malmoense</i>	<i>M. M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. haemophilum</i>
<b>Doenças cutâneas</b>		<i>M. marinum</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. ulcerans</i>	Complexo <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. haemophilum</i>
<b>Forma disseminada</b>		Complexo <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. haemophilum</i>	<i>M. M. abscessus</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. conspicuum</i> , <i>M. marinum</i> , <i>m. fortuitum</i>
<b>Doenças nosocomiais: infecções cirúrgicas (cirurgias cardíacas, mamoplastia); infecções de cateteres (bacteremia, peritonites e abscessos)</b>		<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> .	
<b>Doença de Crohn</b>		<i>M. paratuberculosis</i>	

Fonte: ATS, 1997.

### 2.8.3 Teste de sensibilidade aos antimicobacterianos

*M. tuberculosis* é uma espécie que geralmente apresenta sensibilidade constante aos antimicobacterianos e responde bem aos esquemas terapêuticos padronizados. O teste de sensibilidade para isolados de *M. tuberculosis* passa a ser recomendado em alguns casos, como para pacientes com baciloscopia positiva que não se torna negativa após três meses de tratamento, para pacientes com baciloscopia negativa que volta a ser positiva durante o tratamento para TB e para aqueles tratados previamente para TB, isto é, nos casos de recidivas. O teste de sensibilidade também pode ser útil durante o tratamento de pacientes com HIV

positivo/SIDA e tuberculose, pacientes com TB que mantêm contato com outros pacientes com suspeita de TB resistente ou TB resistente confirmada (ROSSETTI *et al.*, 2002).

Análises genéticas e moleculares feitas em bacilos resistentes de *M. tuberculosis* sugerem que a resistência é de ordinário adquirida por alterações no alvo do fármaco, como consequência de mutações no gene que codifica este alvo. Durante a exposição do *M. tuberculosis* ao fármaco, existe pressão seletiva para mutantes resistentes. As linhagens de *M. tuberculosis*, resistentes a um ou mais fármacos, surgem após uma seqüência de mutações em diferentes genes envolvidos com cada um dos fármacos (ROSSETTI *et al.*, 2002; BARCO *et al.*, 2003).

O teste de sensibilidade aos antimicobacterianos deve ser sempre realizado, pois auxilia tanto na orientação terapêutica quanto na identificação, uma vez que as micobactérias não tuberculosas apresentam percentuais elevados de resistência. Quando são isoladas de pacientes não tratados amostras resistentes a duas ou mais drogas, deve-se suspeitar de que não se trata do bacilo da tuberculose e o isolado deve ser então identificado bioquimicamente, evitando que casos de micobacterioses sejam tratados como tuberculose resistente (ANDRADE, 1986).

O uso de drogas antimicobacterianas no tratamento de MNTB é limitado pela alta prevalência de resistência. As MNTB, inicialmente sensíveis aos antimicobacterianos, tornam-se resistentes mais rapidamente do que o bacilo da tuberculose durante o tratamento. É, portanto, necessário um acompanhamento laboratorial constante do caso, e, como existe pouca correlação entre o teste de sensibilidade, o esquema prescrito e a resposta clínica, preconiza-se utilizar tantos antimicobacterianos potencialmente eficazes quantos o paciente puder tolerar (ANDRADE, 1986; WOLINSKY, 1992; MURRAY *et al.*, 1998; CDC, 1993) (TABELA 12). O tempo de tratamento não deve ser inferior a 24 meses e a recidiva ocorre em 16 a 20% dos casos (RIZZON *et al.*, 1993). Esta resistência das MNTB aos antimicobacterianos justifica a intervenção cirúrgica precoce na maioria dos casos em que a doença é localizada (MORAES *et al.*, 1996).

**TABELA 11** – Esquemas terapêuticos recomendados para o tratamento de micobacterioses

<i>Mycobacterium</i>	Esquema padrão	Esquema adicional
MAC (doença pulmonar crônica), <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. simiae</i>	RIF, ETH, INH, STM ou AMIK	CLAR (AZI), CIP, CLOF
MAC (doença disseminada)	CLAR (AZI), ETH	CLOF, RIFB, RIF, CIP, AMIK
<i>M. kansasii</i> , <i>M. szulgai</i>	RIF, INH, ETH	STM, CIP, CLAR
<i>M. xenopi</i>	RIF, INH, ETH	STM
<i>M. marinum</i>	ETH, RIF, DOX ou TMP-SMX	STM, CIP
<i>M. haemophilum</i>		RIF, CFOX, DOX, TMP-SMX
<i>M. fortuitum</i>	AMIK, CIP, SULF	CLO, CLAR, CFOX, DOX, IPM
<i>M. abscessus</i>	AMIK	CLOF, CLAR, CLOX
<i>M. chelonae</i>	TOB (AMIK)	CLOF, CLAR, DOX

Abreviaturas: RIF – Rifampicina; ETH – Etambutol; INH – Isoniazida; STM – Estreptomicina; AMK – Amicacina; CLAR - Claritromicina; AZI – Azitromicina; CIP – Ciprofloxacina; CLOF – Clofazimina; RIFB - Rifabutin; DOX – Doxiciclina; TMP-SMX – Trimetoprim- sulfametoxazol; CFOX – Cefoxitina; SULF – Sulfonamidas; IPM – Imipenem; TOB – Tobramicina.

Fonte: CDC, 1993.

## 2.9 Diagnóstico de tuberculose e de micobacterioses por PCR

Nas últimas décadas, tem-se a oportunidade de testemunhar o desenvolvimento de uma nova frente de investigação, conhecida como Biologia Molecular, que permite avanços no diagnóstico de doenças diversas, dentre elas a tuberculose (BOLLELA *et al.*, 1999). Após a extração e análise, a especificidade do material genético permite diagnósticos precisos, inclusive das mutações gênicas dos indivíduos em estudo.

Na tuberculose, as técnicas de hibridização representam verdadeira revolução no estudo da doença. A aplicação destas técnicas de hibridização ocorre em qualquer área, desde a epidemiologia até a prevenção, mas é no diagnóstico

que se faz sentir sua grande importância, pois proporciona a obtenção de resultados mais sensíveis e mais rápidos do que os métodos convencionais (SHANKAR *et al.*, 1991; ROSEMBERG *et al.*, 1993; SCHUTZBANK *et al.*, 1993; HIRATA *et al.*, 1995; AFIUNE, 1996; SITNIK *et al.*, 1996; ROSALES, 1997).

Dentre as técnicas de amplificação de DNA micobacteriano, a reação em cadeia da polimerase (PCR – polimerase chain reaction) é a mais desenvolvida e a que apresenta melhores resultados (HIRATA *et al.*, 1997). Esta técnica tem a capacidade de amplificar um fragmento de DNA, *in vitro*, de um gene de determinado microrganismo, mediante a escolha adequada de um par de iniciadores (*primers*). As seqüências específicas de DNA são amplificadas mais de um milhão de vezes em algumas horas (MARTIRE, 2002).

O primeiro alvo de amplificação utilizado na PCR no diagnóstico da tuberculose foi um segmento do gene que codifica uma proteína de 65κDa (BRISSENO-NOËL *et al.*, 1989; PAO *et al.*, 1990). Desde então, uma grande variedade de regiões-alvo do genoma micobacteriano é descrita para utilização na PCR: os genes alvos que codificam as proteínas MPB 64 (SHANKAR *et al.*, 1991), *mtp40* (PARRA, *et al.*, 1991), 32κDa (SOINI *et al.*, 1992) e a 38κDa (MIYAZAKI *et al.*, 1993); o gene *dnaJ* (TAKEWAKI *et al.*, 1993); o gene que codifica a subunidade 16S do DNA ribossomal (rRNA 16S) (BÖDDINGHAUS *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1990) e várias seqüências de repetição específicas (EISENACH *et al.*, 1990).

Para o diagnóstico de MNTB, os iniciadores mais utilizados são os que amplificam um fragmento gênico da seqüência 16S que codifica a subunidade 16S do DNA ribossomal (rRNA 16S). Böddinghaus *et al.*, (1990), quando propuseram esta seqüência-alvo, focalizaram os seguintes aspectos: o RNA é constituinte essencial dos ribossomos; a seqüência de RNA é característica de cada organismo, sendo utilizada em estudos de filogenética e toda célula apresenta grande número de fragmentos gênicos que codificam o RNA 16S ribossomal, proporcionando um aumento no rendimento da técnica da PCR.

No diagnóstico da tuberculose causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*, os iniciadores mais utilizados são os que amplificam seqüências de repetição específicas. Em 1990, Eisenach *et al.*, sintetizaram um par de iniciadores

que amplificou um fragmento da seqüência de inserção repetitiva do genoma micobacteriano do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, denominado IS6110.

Inserções seqüenciais (ISs) são elementos genéticos móveis de 0,8 a 2,5Kb de comprimento, com uma repetição invertida em cada extremidade e com um gene que codifica uma enzima, chamada transposase, que intermedeia a sua mobilidade (McHUGH *et al.*, 1997).

ISs são caracteristicamente instáveis e podem causar vários tipos de rearranjos no DNA, como transposição, deleção, inversão e duplicação. As ISs em micobactérias, entretanto, não experimentam transposição freqüentemente, e, assim, pode-se considerar os padrões produzidos pela IS6110 relativamente estáveis (FANDINHO *et al.*, 1997).

Várias inserções seqüenciais diferentes, pertencentes a cinco famílias, já foram descritas nas micobactérias (McHUGH *et al.*, 1997). A seqüência de inserção IS6110, também conhecida como IS986 e IS987 (KENT *et al.*, 1995), pertence à família IS3 (NIEMANN *et al.*, 1997; STEFAN *et al.*, 1997; FANG *et al.*, 1998). A IS6110 é um elemento genético de 1.361 pares de bases nucleotídicas, possuindo uma seqüência de 28 pares de bases nucleotídicas que se repetem de modo invertido e imperfeito nas suas extremidades, com três despareamentos, tendo também repetições diretas de três pares de bases nucleotídicas, que provavelmente resultam de repetições da seqüência-alvo. Entre as diferentes espécies de micobactérias examinadas a IS6110 foi detectada apenas nas espécies do complexo *M. tuberculosis* (THIERRY *et al.*, 1990).

Geralmente, a IS6110 está presente em grande número de cópias na maioria das amostras de *M. tuberculosis* e em baixo número de cópias nas amostras de *M. bovis*. A especificidade e a natureza repetitiva da IS6110 a tornam alvo ideal para amplificação pela PCR (EISENACH *et al.*, 1993; ROSEMBERG, 1993; NOLTE *et al.*, 1993; DIAZ *et al.*, 1994; MARTIRE, 2002). Por outro lado, tanto menor sensibilidade como menor especificidade para esta região foram observadas em algumas cepas de *M. tuberculosis* descritas na Índia e no Vietnã (YUEN *et al.*, 1993).

Vários estudos demonstram o uso da PCR na detecção de *M. tuberculosis* em amostras de escarro e em diversos tipos de amostras clínicas, tais como: líquido

cefalorraquidiano (LCR), líquido pleural, líquido ascítico, sangue, biopsias, lavado brônquico e lavado gástrico. Isto porque, mesmo na hipótese de no material em estudo existir apenas um bacilo, uma molécula do seu DNA ou RNA pode ser multiplicada rapidamente em milhões, facilitando a detecção e identificação de *M. tuberculosis* nestas amostras clínicas, geralmente negativas nos métodos convencionais de diagnóstico da tuberculose (HERMANS *et al.*, 1990; BRISSON-NOEL *et al.*, 1991; CLARRIDGE III *et al.*, 1993; PFYFFER *et al.*, 1996; CHESKY *et al.*, 1998).

### 2.9.1 Componentes da PCR

- a) Solução tampão: fornecerá condições de pH e salinidade ótimas para que a síntese de DNA se processe, além de conter os cofatores necessários, como  $MgCl_2$  e KCl, que são doadores muito estáveis de íons, cofatores indispensáveis para a atividade da enzima Taq DNA-polimerase;
- b) desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
- c) iniciadores ou *primers* - consistem em oligonucleotídeos na forma de cadeia simples, sintetizados de modo a serem complementares às seqüências conhecidas do DNA-alvo. A distância entre os iniciadores é ordinariamente de 50 a 1.500 nucleotídeos. Eles definem os dois extremos da fita de DNA que será amplificada. A escolha dos iniciadores é um dos pontos críticos para a eficiência da técnica de PCR. A especificidade da técnica de PCR decorre da precisão pela qual estes iniciadores se hibridizam com o DNA-alvo; e
- d) enzima Taq DNA-polimerase - enzima termoestável, isolada da bactéria *Thermus aquaticus* ou clonada em *Escherichia coli* (EISENSTEIN, 1990; SCHUTZBANK *et al.*, 1993).

### 2.9.2 Princípio do método

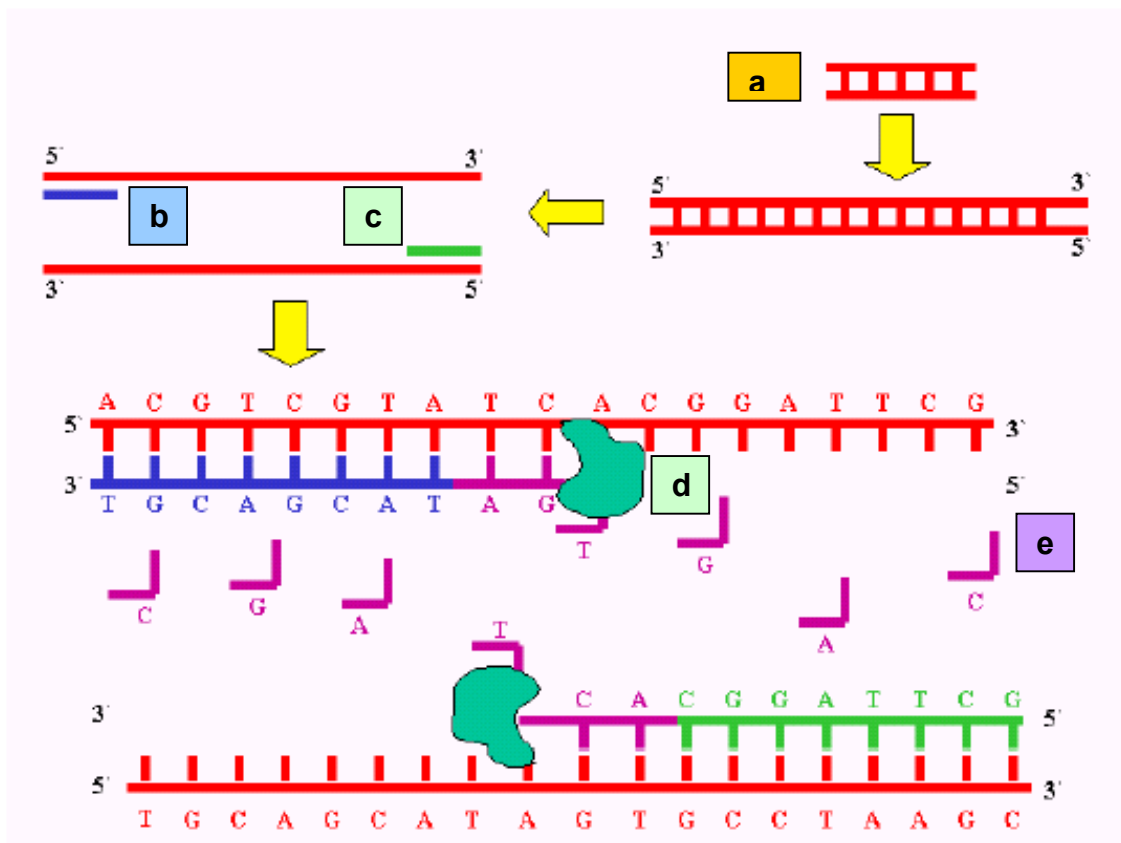
O método para a realização da PCR foi desenvolvido por um grupo de cientistas da Cetus Corporation em 1985. Consiste na repetição cíclica de três reações simples, variando-se apenas a temperatura de incubação de cada etapa.

A primeira etapa da reação consiste na **desnaturação** do DNA-alvo, dupla fita, presente no material clínico, mediante o calor. Ao elevar-se a temperatura acima de 90°C, ocorrem quebra das pontes de hidrogênio e liberação de cadeias únicas de DNA-alvo, tornando-o acessível para hibridização ou anelamento dos iniciadores específicos.

Na segunda etapa, a temperatura é reduzida para 40 a 70°C, permitindo que os dois iniciadores reconheçam as seqüências opostas e complementares do DNA-alvo, ocorrendo o **anelamento** ao material genético.

A terceira etapa, sob temperatura de 72°C, consiste na **síntese** da cadeia complementar do novo DNA, que acontece por meio da extensão de cada iniciador hibridizado, mediada pela Taq-DNA polimerase, na presença de excesso de desoxirribonucleosídeos trifosfatados. Uma nova cadeia de DNA é sintetizada a partir de cada iniciador. Outra característica importante da técnica é o aproveitamento dos produtos sintetizados como matéria-prima para as novas reações de extensão com os iniciadores a cada ciclo.

Repetindo-se essas três etapas, **desnaturação, anelamento e síntese**, por cerca de trinta ciclos, produzir-se-ão mais de 250 milhões de cópias de uma determinada seqüência de DNA em fita dupla, uma vez que o número de cópias cresce de modo exponencial a cada ciclo (FARAH, 1997) (FIGURA 4).

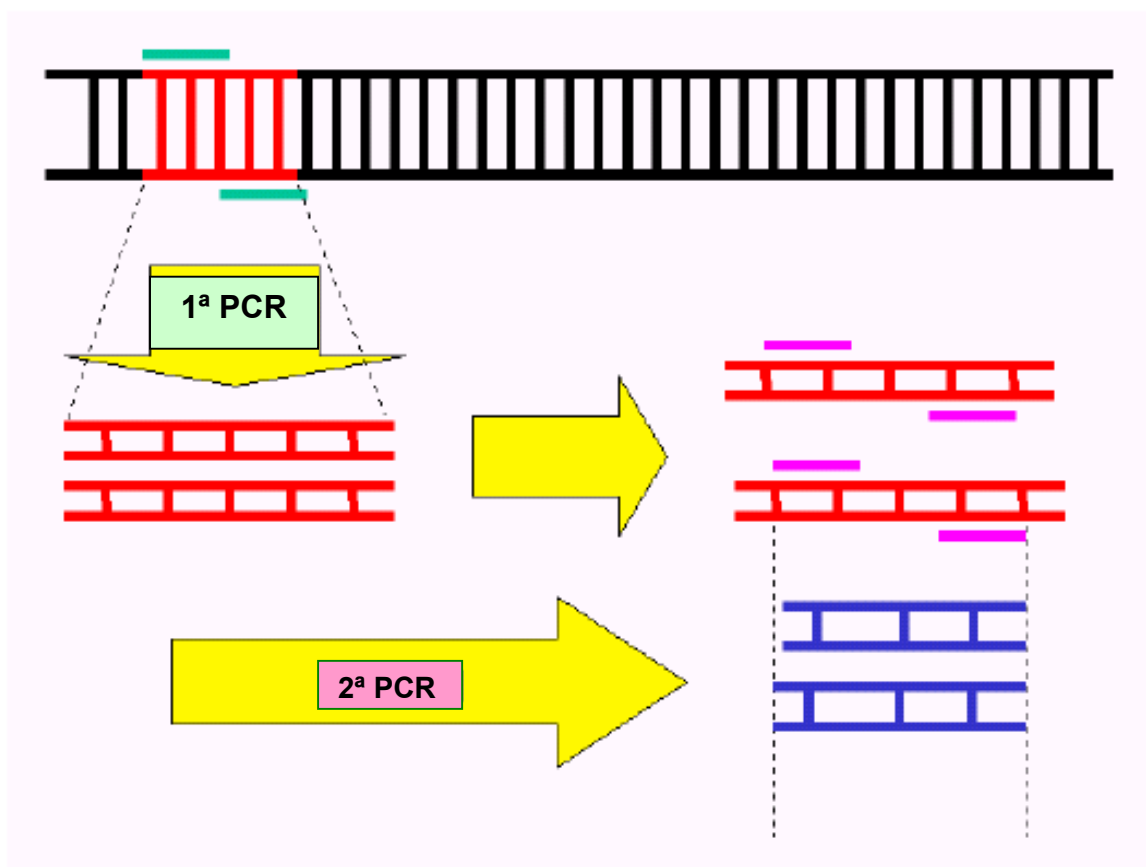


**Figura 4:** Esquema dos processos realizados numa reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a desnaturação das fitas molde (a), ocorre o pareamento dos iniciadores (b e c). A enzima Taq DNA-polimerase (d) adiciona os desoxinucleotídeos (e) complementarmente às fitas-mãe.

Fonte: [www.etall.hpg.com.br](http://www.etall.hpg.com.br)

### 2.9.3 Nested-PCR

A sensibilidade da técnica de PCR pode ainda ser aumentada pela posterior amplificação do produto amplificado, por intermédio da segunda PCR, empregando outro par de iniciadores que tenha como alvo de amplificação um fragmento interno da primeira amplificação (PIERRE *et al.*, 1991; SHANKAR *et al.*, 1991; MIYAZAKI *et al.*, 1993) (FIGURA 5).



**FIGURA 5:** Esquema de uma reação de *Nested* PCR. O produto da primeira amplificação é utilizado como molde na segunda amplificação. No final das duas etapas, obtém-se um produto menor do que o da primeira amplificação.

Fonte: [www.etall.hpg.com.br](http://www.etall.hpg.com.br)

#### 2.9.4 Automação do procedimento

Todo o procedimento é realizado em aparelhos denominados termocicladores, que possuem blocos térmicos capazes de aquecer e esfriar, sucessivamente, a amostra a ser amplificada, de acordo com uma programação previamente definida (temperatura, tempo de incubação e número de ciclos) para cada reação de amplificação.

### **2.9.5 Detecção e análise dos produtos amplificados**

O método geralmente mais usado para a análise dos produtos de PCR é a eletroforese em gel. Usa-se agarose ou poliacrilamida, dependendo do tamanho da seqüência amplificada e do nível de resolução exigido. Em alguns casos, os produtos da amplificação podem ser visualizados diretamente no gel, usando corantes fluorescentes, tais como o brometo de etídio (FARAH, 1997).

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar a eficácia da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico de tuberculose extrapulmonar ou micobacteriose, em líquidos corporais, exceto urina, que são amostras geralmente paucibacilares.

### **3.2 Especifico**

Comparar os resultados obtidos da pesquisa molecular para o gênero *Mycobacterium* e para o complexo *M. tuberculosis* com as clássicas técnicas microbiológicas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras

As amostras foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC-UFC) e pelo Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (LACEN-CE), no período de 2001 a 2003. Foram obtidas de pacientes internados ou em atendimento ambulatorial, com suspeita clínica de tuberculose extrapulmonar, exceto renal.

As 114 amostras clínicas incluem 33 líquidos ascíticos, 30 líquidos pleurais, 29 líquidos cefalorraquidianos, 17 líquidos sinoviais e 5 líquidos pericárdicos. A distribuição das amostras quanto ao local e sítio de obtenção está representada na tabela 13.

**TABELA 12 – Distribuição das amostras clínicas analisadas**

<b>Lab. Central do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC-CE)</b>	
<b>n= 104</b>	
Líquido ascítico	32
Líquido pleural	26
Líquido cefalorraquidiano	26
Líquido sinovial	17
Líquido pericárdico	03
<b>Lab. Central de Saúde Pública da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (LACEN-CE) n=10</b>	
Líquido ascítico	01
Líquido pleural	04
Líquido cefalorraquidiano	03
Líquido sinovial	00
Líquido pericárdico	02

Fonte: elaboração própria.

## 4.2 Procedimentos de rotina microbiológica

A descrição de soluções, meios de cultura e algumas técnicas estão descritas nos Anexos A e B.

### 4.2.1 Baciloscopia

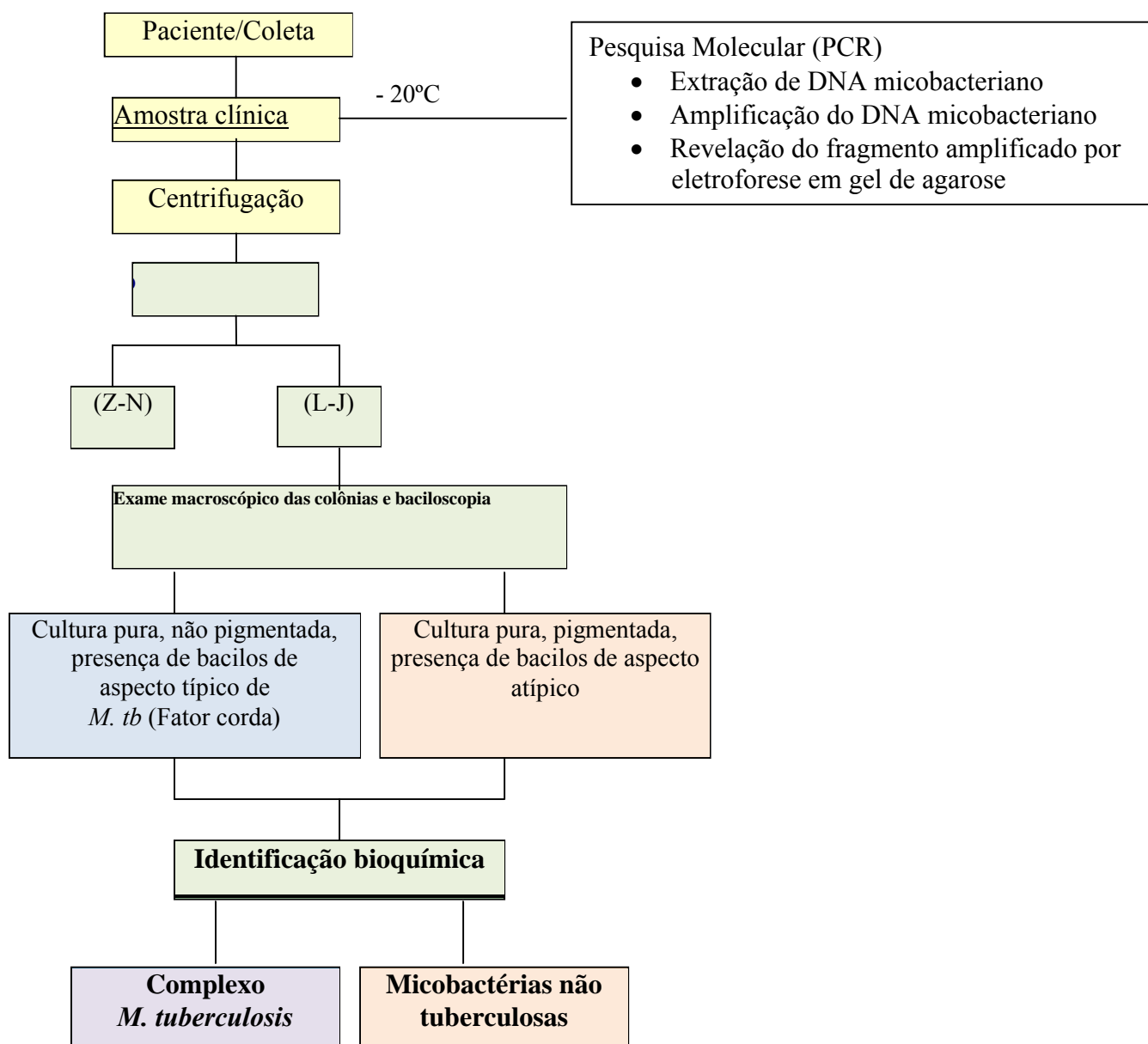
Para os procedimentos microbiológicos, todas as amostras foram centrifugadas e cada amostra ficava geralmente reduzida a um sedimento de volume de 0,5 a 1mL. Aproximadamente 20% do volume do sedimento foi utilizado na preparação da lâmina de esfregaço para pesquisa microscópica do bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR), pela coloração de Ziehl-Neelsen (Z-N), segundo a escala semi-quantitativa padronizada pela Organização Mundial da Saúde, com a contagem do número de bacilos álcool-ácido-resistente (BAAR) por campo microscópico sendo expressa em cruces (BRASIL, 1994; KONEMAN *et al.*, 1993; OPLUSTIL *et al.*, 2000). Os resultados foram devidamente registrados.

### 4.2.2. Cultura

Após a baciloscopia, foram inoculados aproximadamente 50% do volume do sedimento de cada amostra no meio de cultura de Lowestein-Jensen (L-J), os cultivos foram incubados a 37°C e examinados semanalmente para visualização de possível crescimento micobacteriano, durante sessenta dias. Não foi realizada a descontaminação das amostras antes da semeadura no meio de cultivo para micobactérias, pois as amostras obtidas de sítios estéreis são também consideradas estéreis. Quando havia crescimento de colônias no L-J, era realizada a baciloscopia. As espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* apresentam colônias não pigmentadas, e ao exame microscópico demonstram arranjo em corda.

O material restante das amostras, após todos os procedimentos de rotina microbiológica, foi estocado a – 20°C até a realização da PCR. A seqüência de

procedimentos laboratoriais realizados desde a coleta das amostras até a realização da PCR está representada na figura 6.



**FIGURA 6** – Seqüência dos procedimentos laboratoriais realizados neste estudo.

Abreviaturas: PCR: reação em cadeia da polimerase; Z-N: coloração de Ziehl-Neelsen; L-J: meio de Lowenstein-Jensen; *M. tb*: *Mycobacterium tuberculosis*.

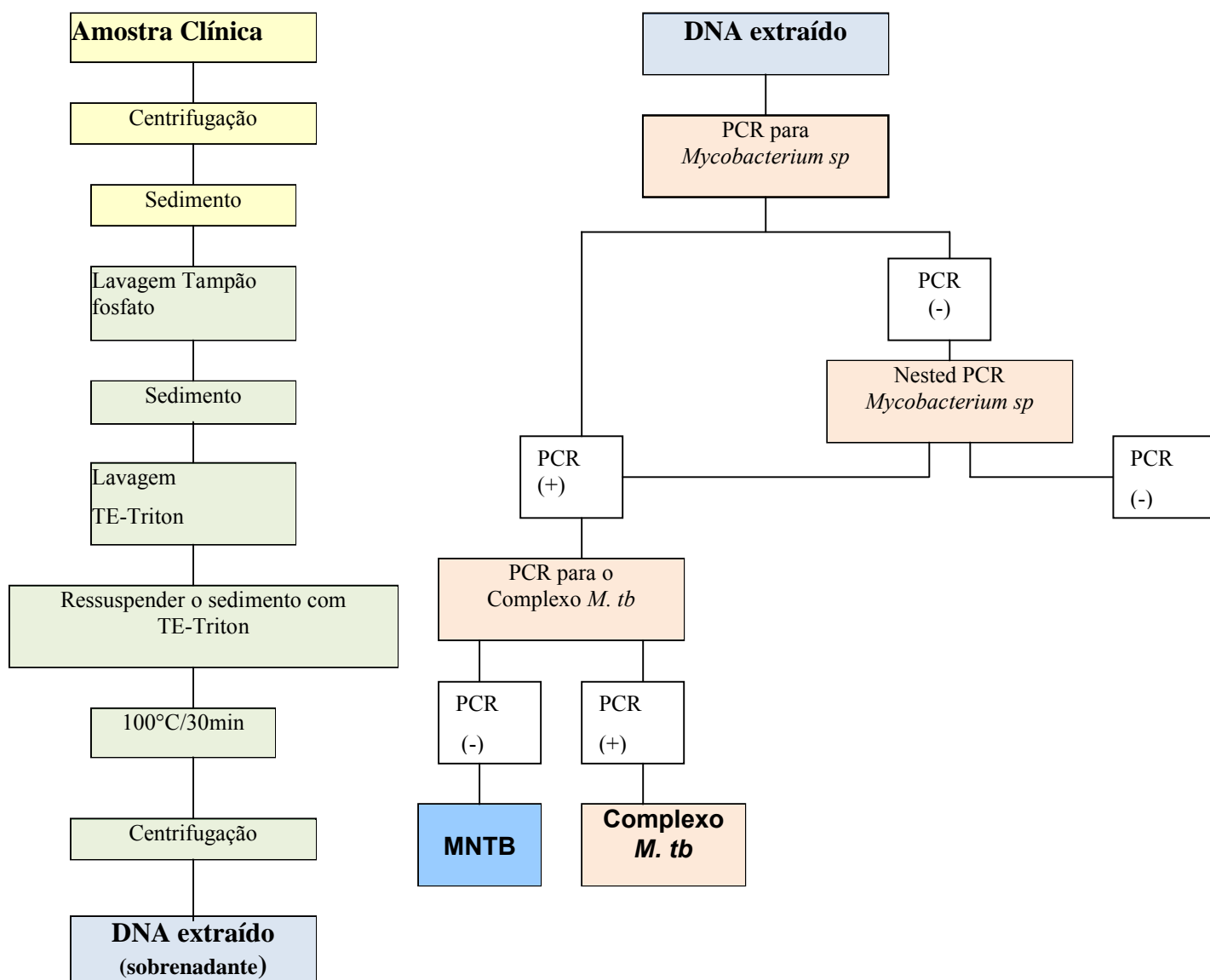
#### 4.2.3. Identificação micobacteriana ao nível de espécie

Na identificação das micobactérias ao nível de espécie, foi empregado o meio de cultura de L-J, contendo o ácido p-nitrobenzóico como prova bioquímica. O meio é preparado com a incorporação de 500 µg/ml do ácido p-nitrobenzóico (PNB -

500 µg/ml) ao meio de L-J, antes da coagulação. A leitura pode ser efetuada em 28 dias, quando se semeia diretamente uma amostra positiva a baciloscopia. Este teste diferencia as espécies do complexo *M. tuberculosis*, que são sensíveis, das demais que não têm o crescimento inibido.

### 4.3 Procedimentos para utilização da PCR

A descrição dos reagentes, soluções e técnicas utilizadas estão descritas nos Apêndices A e B. A seqüência dos procedimentos realizados na pesquisa molecular se encontra na figura 7.



**FIGURA 7** – Seqüência dos procedimentos realizados na pesquisa molecular.

Abreviaturas: TE – Triton: tampão tris-EDTA triton X-100; PCR: reação em cadeia da polimerase; MNTB: micobactérias não tuberculosas; complexo *M. tb*: complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

### 4.3.1 Extração do DNA micobacteriano

Todo o procedimento de extração de DNA foi realizado em Capela de Biossegurança Labconco Purifier Class IIb Total Exhaust, modelo 36210-04, aprovada pelo Ministério da Saúde.

A técnica utilizada foi demonstrada por Clarridge III *et al.* (1993) e consiste na concentração da amostra micobacteriana por centrifugação, e posterior lavagem do sedimento com tampão fosfato pH 6,8 para eliminar substâncias que podem inibir a Taq DNA polimerase, gerando, conseqüentemente, resultados falso-negativos. As micobactérias são lisadas por ebulição em banho-maria e pela ação do detergente não iônico Triton X-100. O sobrenadante de cada amostra contendo o DNA extraído a ser amplificado foi armazenado a 4°C até a realização da PCR.

### 4.3.2 Amplificação do DNA micobacteriano

Todo o procedimento para amplificação do DNA micobacteriano foi realizado em sala individual, e com todos os cuidados necessários para evitar contaminação com os fragmentos de DNA eventualmente presentes no ambiente.

#### 4.3.2.1 Iniciadores utilizados na identificação do gênero *Mycobacterium*

Neste estudo, foram utilizados iniciadores produzidos pela Invitrogen, que amplificam a região intergênica 16S-23S rRNA e que são utilizados para a identificação do gênero *Mycobacterium* (ABED *et al.*, 1995; ROTH *et al.*, 1998; ROTH *et al.*, 2000) (FIGURA 8,9).

<b>Iniciador superior</b>	Sp1 5' ACCTCCTTTCTAAGGAGCACC 3'
<b>Iniciador inferior</b>	Sp2 5' GATGCT CGCAACCACTATCCA 3'

**FIGURA 8** – Seqüência dos iniciadores do gene 16S-23S para identificação do gênero *Mycobacterium*

```

CGTCATGAAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTCGGGAGG
GAGCTGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAG
CCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAGCACCACGA
AAACGCCCAACTGGTGGGGCGTAGGCCGTGAGGGGTTCTTGTCTGTAGT
GGGCGAGAGCCGGGTGCATGACAACAAAGTTGGCCACCAACACACTGTTG
GGTCCTGAGGCAACACTCGGACTTGTTCAGGTGTTGTCCACCGCCTTG
GTGGTGGGGTGTGGTGTTTGAGAACTGGATAGTGGTTGCGAGCATCAATG
GATACGCTGCCGGCTAGCGGTGGCGTGTCTTTGTGCAATATTCTTTGGTT
T(T/G)TGTTGTGTTTGTAAAGTGTCTAAGGGCGCAT

```

**FIGURA 9** – Representação esquemática da localização e seqüência dos iniciadores do gene 16S-23S rRNA. Os produtos da amplificação utilizando estes iniciadores foram fragmentos de 212 pares de bases (pb).

#### 4.3.2.2 Iniciadores utilizados na identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Para a identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, foram utilizados iniciadores produzidos pela Oswel DNA Service, que amplificam a seqüência de inserção IS6110 (FIGURA 10, 11).

<b>Iniciador superior</b>	21-mer 5' GAG CGG GCG GTG CGG ATG GTC 3'
<b>Iniciador inferior</b>	24-mer 5' TCA GCG GAT TCT TCG GTC GTG GTC 3'

**FIGURA 10** – Seqüência dos iniciadores de IS6110 para identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

```

ATGTCAGGTGGTTCATCGAGGAGGTACCCGCCGGAGCTGCGTGAGCGGGCGG
TGCGGATGGTCGCAGAGATCCGCGGTCAGCACGATTCGGAGTGGGCAGCGAT
CAGTGAGGTCGCCCGTCTACTTGGTGTTGGCTGCGCGGAGACGGTGCGTAAG
TGGGTGCGCCAGGCGCAGGTCGATGCCGGCGCACGGCCCCGGGACCACGACCG
AAGAATCCGCTGAGCTGAAGCGCTTCGGGCGGGACAACGCCGAATTGCGAAG
GGCGAACGCGATTTTAAAGACCGCGTCGGCTTTCTTCGCGGCCGAGCTCGAC
CGGCCAGCACGC

```

**FIGURA 11** – Representação esquemática da localização e seqüência dos iniciadores do gene *Rv2168c* de *M. tuberculosis* H37Rv, utilizados neste estudo. O gene *Rv2168c* apresenta comprimento de 324 pb e codifica a transposase IS6110. Os produtos da reação de amplificação foram fragmentos de 179 pb

#### 4.3.2.3 Reagentes da reação em cadeia da polimerase

Para um volume final de uma reação de PCR de 25 $\mu$ L, cada 10 $\mu$ L do DNA extraído e/ou controle foi acrescentado a 15 $\mu$ L da mistura (mix) de reagentes da PCR contendo: 6,75 $\mu$ L de água destilada estéril; 2,5 $\mu$ L de tampão (10x)15 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 $\mu$ L de oligonucleotídeos 2,5mM (dNTP); 1,25 $\mu$ L de Dimetil sulfóxido (DMSO); 1 $\mu$ L de cada um dos iniciadores devidamente diluídos (7,5 $\mu$ M/L ou 10pM) e 0,5 $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5U/ $\mu$ L. A ordem de descrição dos componentes da reação corresponde à ordem de pipetagem, sendo que a Taq DNA polimerase deve ser sempre a última a ser pipetada para que a PCR não se inicie antes do preparo do *mix* de reação.

Para diminuir o número de pipetagens, reduzir a possibilidade de contaminação durante a manipulação e proporcionar a correta homogeneização dos componentes da reação de PCR, para cada grupo de amostras a serem processadas, foi preparado inicialmente um *mix* com volume total proporcional ao número de reações a serem realizadas, em tubo único tipo *ependorf*, com capacidade de 1,5mL e depois aliqotado o volume necessário a cada reação em tubos individuais de 200 $\mu$ L (TABELA 13).

**TABELA 13** – Protocolo para preparação do *mix* de reagentes da PCR.

Componentes da PCR	Volume (µL) para uma PCR	Volume (µL) para dez PCR
Água destilada estéril	6,75	67,5
Tampão	2,5	25
DNTP	2	20
DMSO	1,25	12,5
Primer up	1	10
Primer low	1	10
Taq DNA polimerase	0,5	5
Amostra de DNA	10	100 <sup>(1)</sup>
Volume final	25	250 <sup>(2)</sup>

Fonte: dados da pesquisa.

Observações:

<sup>(1)</sup> Volume total das amostras a serem processadas.

<sup>(2)</sup> Volume total do *mix* proporcional ao número de amostras.

#### 4.3.2.4 Controles da reação em cadeia da polimerase

Foram feitos simultaneamente, a cada amplificação das amostras clínicas, os controles positivos com 20 ng de DNA extraído de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e os controles negativos com todos os componentes da PCR acrescidos de 10µL de água destilada estéril, substituindo o DNA. O uso de controles internos na PCR é indispensável, pois promove o monitoramento do processamento da amostra clínica e do desempenho da reação (SAMBROOK *et al.*, 1989).

#### 4.3.2.5 Protocolos de amplificação

A amplificação para identificar o gênero *Mycobacterium* foi realizada usando termociclador (Perkin-Elmer, GeneAmp PCR System 9700) em um total de 38 ciclos. A amplificação consistiu de uma fase de desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 38 ciclos com um minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a 59°C para anelamento dos iniciadores ao DNA micobacteriano e um minuto à 72°C

para extensão ou polimerização do material amplificado de cada ciclo. Para finalizar a reação, manteve-se a temperatura a 72°C por 15 minutos, para a polimerização dos fragmentos incompletos (TABELA 15). O material amplificado foi estocado a 4°C até a realização da eletroforese.

**TABELA 14** – Etapas da amplificação de DNA micobacteriano utilizando os iniciadores 16S-23S rRNA (gênero-específico)

<b>Etapas da PCR</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
<b>Desnaturação inicial</b>	94°C	5 minutos	1
<b>Desnaturação</b>	94°C	1 minuto	} 38
<b>Anelamento</b>	59°C	1 minuto	
<b>Extensão</b>	72°C	1 minuto	
<b>Extensão final</b>	72°C	15 minutos	1

Fonte: dados da pesquisa.

A amplificação para a identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* foi realizada usando termociclador (Perkin-Elmer, GeneAmp PCR System 9700) (FIGURA 12) em um total de 25 ciclos. A amplificação consistiu de uma fase de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos com 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 63,4°C para anelamento dos iniciadores ao DNA micobacteriano e 30 segundos a 72°C para extensão ou polimerização do material amplificado de cada ciclo. Para finalizar a reação conservou-se a temperatura a 72°C por 15 minutos, para a polimerização dos fragmentos incompletos (TABELA 15). O material amplificado foi estocado a 4°C até a realização da eletroforese.

**TABELA 15** – Etapas da amplificação de DNA micobacteriano, utilizando os iniciadores IS6110 (espécie-específico)

Etapas da PCR	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
<b>Desnaturação inicial</b>	94°C	2 minutos	1
<b>Desnaturação</b>	94°C	30 segundos	} 25
<b>Anelamento</b>	63,4°C	30 segundos	
<b>Extensão</b>	72°C	30 segundos	
<b>Extensão final</b>	72°C	15 minutos	1

Fonte: dados da pesquisa.



**FIGURA 12** - Termociclador (Perkin-Elmer, GeneAmp PCR System 9700)

Fonte: fotografada pela autora.

#### 4.3.2.6 NESTED PCR

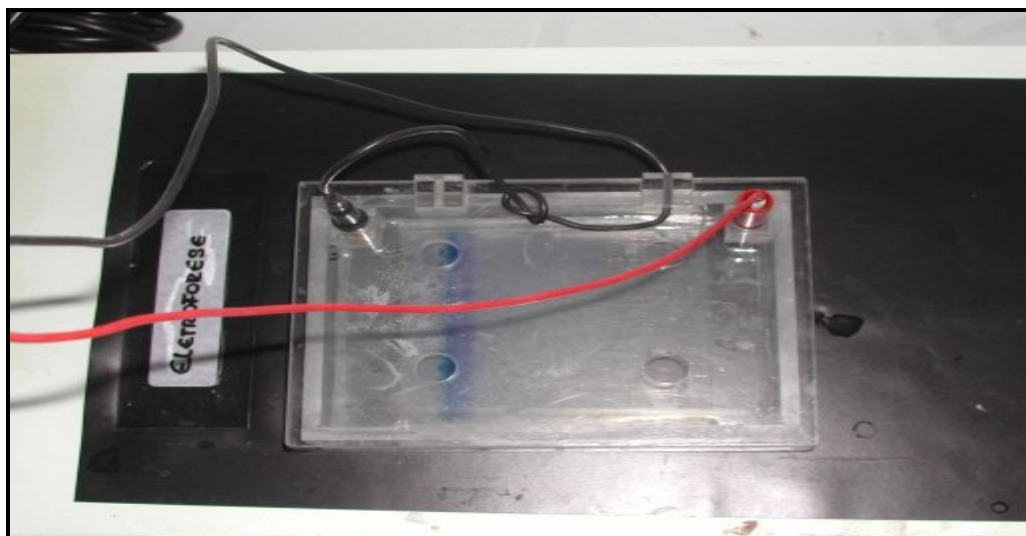
Para aumentar a sensibilidade da reação de PCR, aplicou-se a técnica *Nested-PCR*, porém empregando os mesmos iniciadores. Usou-se *Nested-PCR* em todas as 104 amostras PCR negativas, distribuídas em 20 “pools” de cinco amostras e um “pool” de quatro amostras.

#### 4.3.2.7 Revelação do fragmento amplificado

Foram acrescentados a cada alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de material amplificado, controles e ou marcador de peso molecular, 4 $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento da amostra (*Loading buffer*) e 6  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril, obtendo-se um volume final de 15  $\mu\text{L}$  de amostra, devidamente preparada para ser submetida a eletroforese. O tampão de carregamento torna o DNA mais denso do que o tampão de corrida eletroforética, fazendo-o permanecer nos poços de aplicação de amostras do gel de agarose. Além disso, os corantes azul de bromofenol e xileno cianol, presentes no tampão de carregamento, possuem mobilidade eletroforética, que fornece informações sobre o andamento da eletroforese, indicando o momento de interrompê-la.

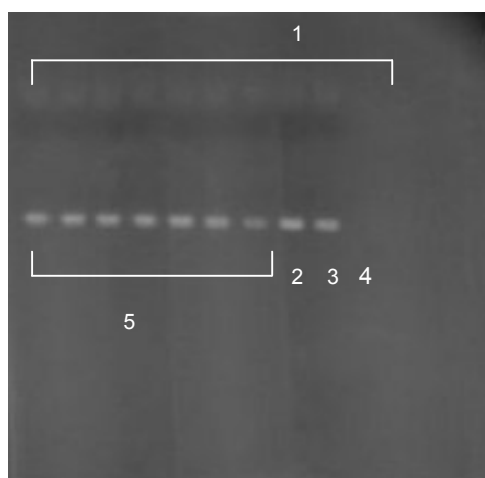
Alíquotas de 10 $\mu\text{L}$  das amostras amplificadas e controles foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão tris-borato EDTA pH 8,0 (TBE). Tanto no tampão eletroforético, como no gel de agarose, foram adicionados brometo de etídio, corante fluorescente empregado para detectar DNA em géis de agarose e poli(acrilamida). A corrida eletroforética foi aplicada por duas horas a 50 volts (FIGURA 13).

O material amplificado foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta a 302nm (FARAH, 1997).



**FIGURA 13** – Corrida eletroforética

Fonte: fotografada pela autora.



Fonte: fotografada pela autora.

**FIGURA 14** – Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação da PCR 16S-23S rRNA. Numerações: 1 – poços de aplicação do material amplificado; 2 – marcador de peso molecular de 100 bp (212 pb); 3 – posição do controle positivo (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv); 4 – posição do controle negativo, usando água destilada e 5 – seqüência de sete amostras PCR positivas para o gênero *Mycobacterium*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Pacientes e amostras

As amostras analisadas foram obtidas de 114 pacientes com suspeita clínica de tuberculose extrapulmonar, exceto renal, internados ou em atendimento ambulatorial. Estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC-UFC) e ao Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria de Saúde Pública do Estado do Ceará (LACEN-CE), para análise microbiológica.

A rotina laboratorial solicitada para a maioria destes pacientes incluiu, entre outros exames, pesquisa direta e cultura para BAAR, pesquisa direta e cultura para fungos e culturas bacterianas outras. Na população estudada, teve-se acesso aos prontuários de 67 pacientes: destes, a idade média foi de 45 anos, sendo a mínima de 1 ano e a máxima de 89 anos. Quanto ao sexo, 37% eram mulheres e 63% homens. Quanto ao local de origem, 36 pacientes eram nascidos na capital do Estado do Ceará, 30 no restante do Estado e apenas um paciente nascido noutro Estado. Somente três pacientes relataram o diagnóstico de tuberculose pulmonar durante alguma fase da vida, assim como, a ocorrência de casos de tuberculose na família. E apenas um paciente relatou o diagnóstico de tuberculose pulmonar durante alguma fase da vida sem a ocorrência de tuberculose na família. Estes quatro pacientes receberam tratamento adequado e não relataram reativação da doença.

### 5.2 Resultados microbiológicos

Das 114 amostras estudadas, a baciloscopia e a cultura em L-J para micobactérias foram negativas em todas as amostras.

Durante este estudo, outros isolamentos foram observados: em um líquido ascítico, foi isolado *Staphylococcus aureus*; em duas amostras de líquido sinovial, foram isolados, distintamente, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus*

*epidermidis*; em um líquido pleural, foi isolado *Klebsiella pneumoniae* e, em quatro amostras de líquido, foram isolados, distintamente, *Cryptococcus neoformans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* (TABELA 16).

Durante a coleta de amostras para este estudo, três pacientes internados receberam tratamento empírico para tuberculose, não havendo posterior confirmação de tuberculose extrapulmonar pelos métodos laboratoriais convencionais.

Outras doenças infecto-contagiosas foram diagnosticadas em quatro pacientes durante este estudo, sendo elas hepatite B, hepatite C, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e toxoplasmose.

### **5.3 Resultados da reação em cadeia da polimerase**

A PCR para o gênero *Mycobacterium* foi positiva em dez amostras. A PCR para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* foi negativa em todas as amostras (TABELA 16). A *Nested* PCR foi realizada em todas as amostras, inicialmente PCR negativas, e confirmou o resultado citado há pouco.

Os pacientes que tiveram suas amostras PCR positivas para o gênero *Mycobacterium* foram diagnosticados e tratados de suas doenças de base como sendo um caso de miocardite, um de hipertireoidismo descompensado, um de hepatopatia crônica, três de sinovite e quatro casos de mielopatias.

**TABELA 16** – Resultados obtidos pelos métodos microbiológicos e pesquisa molecular por PCR, na detecção de micobactérias, em 114 amostras de pacientes com suspeita clínica de micobacteriose extrapulmonar

Tipos de amostras	Métodos convencionais			PCR		Outros isolamentos <sup>(1)</sup>			
	N total	Z-N	L-J	<i>Mycobacterium sp</i>	Complexo <i>M. tb</i>	<i>Staph. sp</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. neoformans</i>
Líqu. ascítico	33	Neg	Neg	01	Neg	02	Neg	Neg	Neg
Líqu. pleural	30	Neg	Neg	02	Neg	Neg	Neg	01	Neg
Líquor	29	Neg	Neg	04	Neg	02	Neg	01	01
Líqu. sinovial	17	Neg	Neg	03	Neg	Neg	01	Neg	Neg
Líqu. pericárdico	05	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Fonte: dados da pesquisa.

Observação:

- <sup>(1)</sup> Estes outros isolamentos, foram observados nas demais amostras PCR negativas para o gênero *Mycobacterium*.

## 6 Discussão

O exame clínico detalhado, o teste de sensibilidade à tuberculina, o estudo radiográfico, a baciloscopia e a cultura, às vezes, são insuficientes para a definição diagnóstica dos casos de tuberculose pulmonar, extrapulmonar e micobacterioses. Nos países centrais, porém, a baciloscopia é o método disponível para detectar os casos de tuberculose bacilífera, permitindo a interrupção da cadeia de transmissão. Uma baciloscopia negativa não exclui a possibilidade de doença, tanto pulmonar como extrapulmonar, pois, para a obtenção de um resultado positivo na baciloscopia, são necessários pelo menos 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de amostra (BRASIL, 1994).

As amostras extrapulmonares analisadas neste estudo foram escolhidas por serem, geralmente, paucibacilares e, conseqüentemente, apresentarem baixa sensibilidade na baciloscopia e na cultura. Em adição, as amostras paucibacilares requerem um período de incubação mais prolongado, o que torna os métodos microbiológicos clássicos ainda mais demorados, como já relatado em estudos de Cestari *et al.* (1987), Alves *et al.* (1993), Tarasconi *et al.* (1993), Afiune (1996) e Kritski *et al.* (2000).

Ressalte-se que outras amostras extrapulmonares, que apresentam maior positividade na PCR, poderiam ter sido empregadas, como biopsias ou aspirados de pulmão, linfonodo ou medula óssea, uma vez que, estes sítios anatômicos podem albergar *M. tuberculosis* em sua forma latente, mesmo em tecidos aparentemente normais (Honoré-Bouakline *et al.*, 2003).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis*, inclui o *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti* e é o mais importante do gênero *Mycobacterium*, do ponto de vista da etiologia de doenças humanas. Para o isolamento do *Mycobacterium tuberculosis*, a cultura é considerada o método “gold standard” por ter especificidade de 100% e sensibilidade de aproximadamente 90% em casos bacilíferos. Ressalte-se que, para a cultura de uma amostra clínica ser positiva, são necessários entre dez e 100 bacilos viáveis por mililitro de amostra (BRASIL, 1994), enquanto que a PCR é capaz de detectar até uma cópia de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, como descrito por Eisenach *et al.* (1993).

Na década de 1980, com o advento da SIDA, houve um crescimento significativo na incidência da tuberculose, assim como de casos de micobacterioses. As micobacterioses são doenças causadas por micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MNTB) e afetam principalmente imunodeprimidos, idosos e portadores de broncopneumopatias crônicas. Este aumento na incidência de micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MNTB), de significância clínica, também pode estar correlacionado com o aumento do reconhecimento clínico da doença, com os avanços nas técnicas de isolamento em cultura e com o uso cada vez mais freqüente da identificação das micobactérias por técnicas moleculares. Isto porque, não raro, até que a micobactéria seja isolada e identificada, nada faz suspeitar que se trate de uma micobacteriose (FERREIRA, 2001).

A princípio, não se suspeitava que outras micobactérias pudessem causar doença, pois havia o conceito de que estas micobactérias eram germes saprófitos, incapazes de produzir doença no homem. As micobactérias não tuberculosas tornaram-se importantes por vários aspectos, tais como: confundem-se com o bacilo da tuberculose no diagnóstico e podem substituí-lo patologicamente nas lesões e epidemiologicamente na coletividade; provocam doença semelhante à tuberculose e encontram-se nos mais diversos sítios anatômicos; estão largamente difundidas na natureza e nos animais, mesmo sem produzir doença, tornando necessário estabelecer critérios para diferenciar colonização de doença (ANDRADE, 1986; KONEMAN *et al.*, 2001).

O diagnóstico microbiológico das micobacterioses também apresenta as mesmas desvantagens do complexo *Mycobacterium tuberculosis* quanto à baixa sensibilidade e especificidade da baciloscopia, ao lento crescimento das micobactérias patogênicas em cultura, além das complexas técnicas laboratoriais utilizadas na identificação e avaliação da sensibilidade destas micobactérias aos antimicobacterianos (TIMERMAN, 1993). É considerado “caso de micobacteriose” qualquer isolamento de MNTB de amostras extrapulmonares estéreis (ATS, 1997). Neste contexto, o diagnóstico das micobacterioses certamente pode ser favorecido pela técnica da reação em cadeia da polimerase.

Desde que Böddinghaus *et al.* (1990) propuseram a amplificação de um fragmento gênico da seqüência 16S que codifica o RNA 16S ribossomal com a

finalidade de uso clínico, inúmeros pesquisadores descreveram reações de amplificação, utilizando como alvo as regiões espaçadoras 16S-23S do RNA ribossomal, tanto para o gênero *Mycobacterium* como para várias espécies deste gênero (ROTH *et al.*, 1998). Posteriormente, foi descrito um método de PCR multiplex que permite a diferenciação do complexo *M. tuberculosis*, *M. avium* e outras micobactérias em única reação de PCR (CORMICAN *et al.*, 1995; SHRESTHA *et al.*, 2003).

O rendimento dos materiais extrapulmonares para a detecção de micobactérias por baciloscopia e cultura difere conforme o sítio anatômico envolvido e o tipo de material (fragmentos de biopsia, aspirados, líquidos de cavidades e outros).

Nos ensaios de PCR feitos por Clarridge III *et al.* (1993) e KOX *et al.* (1994), com o propósito de avaliar o desempenho da pesquisa molecular em relação aos resultados obtidos pelos métodos convencionais de diagnóstico de *M. tuberculosis* em amostras clínicas variadas e escarro, observou-se uma positividade de aproximadamente 100% na PCR, ao se trabalhar com amostras positivas para baciloscopia e cultura, e uma positividade de 60%, ao se trabalhar com amostras negativas para baciloscopia e cultura.

Kirschner *et al.* (1996) realizaram estudo prospectivo durante 18 meses, avaliando a técnica da PCR no diagnóstico de micobacterioses. De um total de 8.272 amostras, 729 foram selecionadas para serem submetidas a PCR, tendo o gene que codifica o RNA 16S ribossomal como alvo. Primeiramente foram utilizados iniciadores gênero-específicos e, posteriormente, iniciadores espécie-específicos quando necessário. As amostras clínicas incluíram escarros, lavados brônquicos, aspirados, biopsias e vários líquidos corporais (cefalorraquidiano, pleural, peritoneal e gástrico). A sensibilidade e a especificidade da PCR foram de 84,5% e 99,5%, respectivamente. As micobactérias, de relevância clínica, identificadas foram *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. chelonae*. As discrepâncias encontradas em relação à baciloscopia, cultura e PCR foram justificadas como consequência da limitação dos testes microbiológicos, em decorrência da baixa carga bacilar, possível erro na homogeneização das amostras e presença de inibidores na amostra.

Neste estudo, para evitar a ocorrência de resultados falso-positivos em decorrência de contaminação e falso-negativos pela inibição da PCR, foram tomadas

algumas medidas: utilização de salas isoladas para extração, preparação do *mix* de reação e adição da amostra ao *mix* de reação; o uso de controles internos (negativo e positivo); utilização de material de proteção como luvas, jalecos, máscaras; o uso de ponteiros estéreis descartáveis; o emprego de capela de fluxo laminar e a realização da *Nested-PCR*. O método de extração empregando o tampão tris-EDTA – Triton foi escolhido em razão de sua facilidade de preparação; por conter o EDTA, que evita a degradação do DNA, além de que, no estudo realizado por Sritharan *et al.* (1991), foi demonstrado que esta técnica de extração pode detectar até dez bacilos por amostra clínica.

Mesmo sabendo-se que o tratamento antimicobacteriano interfere de forma negativa na baciloscopia (diminuindo a carga bacilar da amostra) e na cultura (reduzindo a viabilidade do bacilo), as três amostras de pacientes distintos que receberam tratamento empírico para tuberculose não foram excluídas porque a técnica da PCR não faz distinção entre bacilos vivos e mortos, podendo ocasionar um resultado falso-positivo para a doença em atividade, o que não ocorreu.

Apesar de podermos considerar a presença de inibidores que interferem na PCR, nas quatro amostras de pacientes nos quais foram diagnosticadas outras doenças infecto-contagiosas, assim como nas amostras onde foram observados isolamentos bacterianos distintos, estas não foram excluídas da análise molecular em decorrência da especificidade dos iniciadores (EISENACH *et al.*, 1993; HONORÉ-BOUAKLINE *et al.*, 2003; ROTH *et al.*, 2000).

O maior rendimento da PCR para o gênero *Mycobacterium* em relação à cultura pode ser decorrente da limitação deste último método, que tem uma sensibilidade teoricamente menor que a da PCR. A extrema sensibilidade da técnica, no entanto, permite questionamentos no que concerne à obtenção de resultados falso-positivos por patógenos latentes, o que limita o valor da PCR no diagnóstico da infecção ativa, sendo necessário o estabelecimento de uma perfeita correlação clínico-bacteriológica.

Os pacientes que tiveram suas amostras PCR positivas para o gênero *Mycobacterium*, apesar de não serem portadores da SIDA, população na qual a MNTB são isoladas com maior frequência, eram pacientes portadores de processos crônicos (câncer uterino, artrite, mielopatia, insuficiência renal crônica, transplantado renal, miocardite) submetidos a várias internações, cirurgias e tratamentos

quimioterápicos, sendo estas condições predisponentes à infecção por MNTB, pois estreitamente relacionadas com algum grau de imunodepressão (LUNA, 2001).

As amostras PCR positivas para o gênero *Mycobacterium* poderiam ter sido identificadas ao nível de espécie. Para tanto, seria necessário utilizar uma enzima de restrição para digerir o produto amplificado (Hae III) e, em seguida, comparar os fragmentos com os padrões publicados (ROTH *et al.*, 2000). Saliente-se que a identificação da micobactéria ao nível de espécie, quer seja por testes bioquímicos ou moleculares, fornece dados importantes para estudos epidemiológicos e para o delineamento de estratégias de controle das MNTB, principalmente as espécies que habitam a água e o solo. Nesta pesquisa, não houve cultura positiva para micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, para que fosse realizada a identificação da espécie por provas bioquímicas, e a identificação molecular não foi realizada, em razão da impossibilidade de adquirir a enzima de restrição Hae III.

Segundo Kritski *et al.* (1997), um dos fatores que interferem na sensibilidade e especificidade da técnica da PCR é o tipo de padrão-ouro escolhido (cultura positiva para micobactérias ou diagnóstico clínico provável de tuberculose extrapulmonar); nesta pesquisa, a triagem das amostras clínicas foi realizada em decorrência da suspeita clínica de tuberculose extrapulmonar. Os resultados demonstraram baixa positividade para o gênero *Mycobacterium* (10/114), e ausência de positividade para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, possivelmente em decorrência da variabilidade da avaliação clínica, já que nos casos de tuberculose extrapulmonar ou micobacteriose as manifestações clínicas são inespecíficas e insidiosas.

## 7 CONCLUSÕES

O desenvolvimento desta pesquisa mostrou-se útil na implantação da unidade de pesquisa de micobactérias, na adaptação das técnicas de extração, amplificação de DNA micobacteriano, detecção dos fragmentos amplificados e na elaboração de protocolos que viabilizam a pesquisa molecular por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), da infecção pelo gênero *Mycobacterium* e pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Neste estudo, a baciloscopia, a cultura e a PCR para o complexo *M. tuberculosis* foram negativas para todas as amostras. Foram, porém, detectados dez casos de amostras positivas para o gênero *Mycobacterium*, que, apesar de não terem sido identificadas ao nível de espécie, alerta os clínicos sobre a possibilidade da ocorrência de micobacteriose e abre questionamentos quanto aos critérios para o diagnóstico de micobacterioses.

Com suporte no desenvolvimento desta pesquisa, ressalta-se que, para a implementação da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como um complemento no diagnóstico laboratorial de micobactérias, é indispensável a definição de critérios para sua utilização, padronização da PCR de acordo com a amostra e o agente etiológico a ser identificado, uso simultâneo de iniciadores que identifiquem o agente etiológico ao nível de gênero e espécie, avaliação constante das etapas da PCR (controle de contaminação, inibição, escolha adequada do método de extração, uso obrigatório de controles internos) e interpretação dos resultados obtidos pela PCR juntamente com os obtidos pela baciloscopia e cultura.

Pesquisas como esta, que visa à implementação de métodos mais rápidos, sensíveis e específicos à rotina laboratorial, são úteis e significativas, pois o Laboratório de Microbiologia exerce uma função de destaque na quebra da cadeia de transmissão e ou evolução da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABED, Y.; DAVIN-REGLI, A.; BOLLET, C.; DE MICCO, P.. Efficient discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by 16S-23S spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1418-1420, 1995.

AFIUNE, J. B. Clínica e diagnóstico. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R.. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. v.1, cap. 74, p. 919-925.

AFIUNE, J. B. Tuberculose extrapulmonar. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R.. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. v.1, cap. 74, p. 942-947.

AFIUNE, J. B.; GONÇALVES, M. J. P. R.; FIUZA DE MELO, F. A.. Adenosinadeaminase versus citologia no diagnóstico de derrames pleurais tuberculosos. **Jornal de Pneumologia**, n. 16 (supl), p. 93-94, 1990.

ALVES, M. A. G.; RIZZON, C. F. C.; PICON, P. D.. Tuberculose peritoneal. In: PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.; OTT, W. O.. **Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993. cap. 15, p. 367-373.

ALVES, S. H.; MARCHIORI, R.; HUBER, I. C.; HUBER DA SILVA, S.; RIGHI, R. A.; SANGÓI, S. G.. Principais metodologias para o diagnóstico laboratorial da tuberculose: a importância da enzima adenosinadeaminase (ADA). **Laes&Haes**, Agosto/Setembro, p. 58-64, 1994.

AMATO, A. C. M.; MORILO, M. G.; AMATO, M. C.. Tuberculose abdominal. **Diagnóstico e tratamento**, v. 8, n.2, p. 83-87, 2003.

ANDRADE, L.. Micobactérias atípicas – micobacterioses. Etiopatogenia, diagnóstico, tratamento e epidemiologia. **J. Pneumol.**, v. 12, n. 4, p. 241-248, 1986.

ANG, P.; RATTANA-APIROMYAKIJ, N.; GOH, C. L.. Retrospective study of a *Mycobacterium marinum* skin infections. **Int. J. Dermatol.**, v. 36, n. 5, p. 343-347, 2000.

ATS - American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 156, (suppl.), s1-s25, 1997.

BARCO, P.; CARDOSO, R. F.. Tuberculose e resistência a drogas. **Laes-haes**, ano 24, n. 141, p. 130-144, 2003.

BARRETO, J. A.; PALACI, M.; FERRAZOLLI, L.; MARTINS, M. C.; SULEIM, J.; LORENCO, R.; FERREIRA, O. C. Jr.; RILEY, L. W.; JOHNSON, W. D. Jr.; GALVAO, P.A.. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from bone marrow aspirates of AIDS patients in Brazil. **J. Infect Dis.**, v. 168, n. 3, p. 777-779, 1993.

BARTON, A.; BERNSTEIN, R. M.; STRUTHERS, J. K.; O'NEIL, T. W.. *Mycobacterium marinum* infection causing septic arthritis and osteomyelitis. **Br. J. Rheumatol.**, v. 36, n. 11, p. 1207-1209, 1997.

BERNARD, L.; VINCENT, V.; LORTHOLARY, O.; RASKINE, L.; VETTIER, C.; COLAITIS, D.; MECHALI, D.; BRICAIRE, F.; BOUVET, E.; BANI SADR, F.; LALANDE, V.; PERRONNE, C.. *Mycobacterium kansasii* septic arthritis: French retrospective study of 5 years and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 6, p. 1455-1460, 1999.

BÖDDINGHAUS, B.; ROGALL, T.; FLOHR, T.; BLÖCKER, H.; BÖTTGER, E. C.. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. **Journal of Clinical Microbiology**, V. 28, n. 8, p. 1751-1759, 1990.

BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L.. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Rev. Saúde Pública**, v. 33, n. 3, p. 281-286, 1999.

BOTHAMLEY, G. H. *apud* FERREIRA, M. A. S.; FONSECA, L. S.. Diagnóstico sorológico da tuberculose. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.18, n. 1, p. 41-56, 1997.

BRANT, C. Q.; SILVA, M. R. Jr.; MACEDO, E. P.; VASCONCELOS, C.; TAMAKI, N.; FERRAZ, M. L. G.. The value of adenosinedeaminase (ADA) determination in the diagnosis of tuberculous ascites. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v. 37, n. 5, p. 449-453, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Disponível em: [www.funasa.gov.br/guia\\_epi/htm/doencas/tuberculose/situacao\\_doenca.htm](http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/tuberculose/situacao_doenca.htm). Acessado em: 13 maio 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 5ªed. Brasília: FUNASA, 2002. 842p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. 2ªed. Rio de Janeiro: 1994. 115p.

BRISSON-NÖEL, A.; AZNAR, C.; CHUREAU, C.; NGUYEN, S.; PIERRE, C.; BARTOLI, M.; BONETE, R.; PIALOUX, G.; GICQUEL, B.. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. **The Lancet**, v. 338, p. 364-366, 1991.

BRISSON-NÖEL, A.; GICQUEL, B.; LECOSSIER, D.; LEVY-FRÉBAULT, V.; NASSIF, X.; HANCE, A. J.. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. **The Lancet**. v. 2, n. 1, p. 1069-1071, 1989.

CAMPOS, H, S.. Diagnóstico e tratamento da tuberculose. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, v. 20, n. 7, p.267-281, 1991.

CASAL, M.. Cómo denominar a las micobacterias diferentes a *Mycobacterium tuberculosis* y a *M. leprae*. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 21, n.6, p. 296-298, 2003.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations on prophylaxis and therapy for disseminated *Mycobacterium avium* complex for adults and adolescents infected with human immunodeficiency virus. **Morbid. Mortal. Weekly Rep.**, v. 42, n. 9, p. 14-20, 1993.

CEARÁ. Secretaria de Saúde do Estado. Célula de Informação em Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)**. Acessado em: 29 maio 2003.

CESTARI FILHO, F.; RASSI, R. H.; MENDONÇA, S. A. D.. Atividade da adenosinadeaminase no diagnóstico do derrame pleural. **Rev. Paul. Med.**, n. 105, p. 276-278, 1987.

CHEMALAL, K.; PORTAELS, F.. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, n. 2, p. 77-83, 2003.

CHESKY, M.; SCALCO, R.; FAILACE, L.; READ, S.; JOBIM, L. F.. Diagnóstico molecular das infecções do sistema nervoso central pela reação em cadeia da polimerase. **RBAC**, v. 30, n. 3, p. 131-136, 1998.

CLARRIDGE III, J. E.; SHAWAR, R. M.; SHINNICK, T. M.; PLIKAYTIS, B. B.. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2049-2056, 1993.

COOK, V. J.; TURENNE, C. Y.; WOLFE, J.; PAULS, R.; KABANI, A.. Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1010-1015, 2003.

COPPENRAET, L. E. S. B.; KUIJPER, E. J.; LINDEBOOM, J. A.; PRINS, J. M.; CLAAS, E. C. J.. *Mycobacterium haemophilum* and lymphadenitis in children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 62 – 68, 2005.

CORMICAN, M.G.; JONES, R. N.. Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of a AIDS patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 8, p. 2230, 1995.

CORMICAN, M.G.; GLENNON, M.; RIAIN, U. N.; FLYNN, J.. Multiplex PCR for identifying micobacterial isolates. **J. Clin. Pathol.**, v. 48, n. 3, p. 203-205, 1995.

CORRÊA DA SILVA, L. C.. Tuberculose extrapulmonar (excetuado o derrame pleural). **Jornal de Pneumologia**, v. 19, n.2, p.83-87, 1993.

DANIEL, T. M.. Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory thechiques applicable in development countries. **Rev. Infect. Dis.**, v. 11, n. 2 (suppl), s471-s478, 1989.

DE JUAN MARTÍN, F.; MARIN, B. M. C.; BOUTHELIER, M. M.; LEZCANO, C. M. A.; ZUBIRI, A. L.; ADIEGO, L. M. I.. Nontuberculous bacterial infection in immunocompetent children. **An. Esp. Pediatr.**, v. 56, n. 4, p.357-359, 2002.

DIAZ, R.; MONTORO, E.; MAESTRE, J. L.; ECHEMENDIA, M.; VLDIVIA, J. A.. Polimerase chain reaction of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Mem. Inst. Oswaldo cruz**, v.89, n. 2, p. 211-212, 1994.

EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; CRAWFORD. PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In: PERSIN, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J.. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, D.C: American Society of Microbiology, 1993, pp. 191-196.

EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; CRAWFORD. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, v. 161, n. 5, p. 977-981, 1990.

EISENACH, K. D.; SIFFORD, M. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T.. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 144, n. 5, p. 1160-1163, 1991.

EISENSTEIN, B. I.. The polimerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 3, p. 178-183, 1990.

EKEROT, L.; JACOBSSON, L.; FORSGREN, A.. *Mycobacterium marinum* wrist arthritis: local and systematic dissemination caused by concomitant immunosuppressive therapy. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 30, n. 1, p. 84-87, 1998.

EMLER, S.; ROCHAT, T.; ROHNER, P.; PERROT, C.; AUCKENTHALER, R.; PERRIN, L.; HIRSCHL, B.. Chronic destructive lung disease associated with a novel mycobacterium. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 150, n. 1, p. 261-265, 1994.

FANDINHO, F. C. O.; FONSECA, L, S.. Epidemiologia molecular da tuberculose. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.18, n. 1, p. 57-73, 1997.

FANG, Z.; MORRISON, N.; WATT, B.; DOIG, C.; FORBES, K. J.. IS6110 transposition and evolutionary scenario of direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 180, n. 8, p.2102-2109, 1998.

FARAH, S.B.. **DNA: segredos e mistérios**. São Paulo: Editora Sarvier, 1997. cap. 5, p.103-140.

FERREIRA, A W.. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001, p. 221-229.

FERREIRA, M. A. S.; FONSECA, L. S.. Diagnóstico sorológico da tuberculose. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.18, n. 1, p. 41-56, 1997.

FIUZA DE MELO, F. A.. Tratamento. *In*: VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996, v. 1, p. 925-935.

FIUZA DE MELO, F. A.; AFIUNE, J. B.. Patogenia e imunidade. *In*: VERONESI, R., FOCACCIA, R.. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996, v. 1, p. 917-925.

FIUZA DE MELO, F. A.; AFIUNE, J. B.. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. **Jornal de Pneumologia**, v. 19, n.1, p.19-24, 1993.

FIUZA DE MELO, F. A.; HIJAR, M. A.. Tuberculose. *In*: VERONESI, R., FOCACCIA, R.. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. v.1, cap. 74, p. 914-917.

GOLLWITZER, H.; LANGER, R.; DIEHL, P.; MITTELMEIER, W.. Chronic osteomyelitis due to *Mycobacterium chelonae* diagnosed by polymerase chain reaction homology matching: a case report. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 86-A, n. 6, p. 1296-1301, 2004.

GUTIERREZ, M. J.; PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.. Tuberculose cutânea. *In*: PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.; OTT, W. O.. **Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993. cap. 24, p. 479- 486.

HAAS, P.; THIESEN, K.; VITURI, C. L.. Exame do líquido ascítico nos laboratórios do estado de Santa Catarina. **RBAC**, v. 34, n. 2, p. 79-83, 2002.

HERMANS, P. W. M.; SCHUITEMA, A. R. J.; VAN SOOLINGEN, D. J.; VERSTYENEN, C. P. H. J.; BIK, E. M.; THOLE, J. E. R.; KOLK, A. H. J.; VAN EMBDEN, J. D. A.. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 204-213, 1990.

HIJJAR, M. A; OLIVEIRA, M. J. P. R.; TEIXEIRA, G. M.. A tuberculose no Brasil e no mundo. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 2, p. 9-16, 2001.

HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.. Aplicação da biologia molecular no diagnóstico clínico. **Laes&Haes**, Agosto/Setembro, p. 98-108, 1995.

HIRATA, M. H.; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. C.; LEITE, C. Q. F.. Técnicas de amplificação de gene para o diagnóstico da tuberculose. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.18, n. 1, p. 75-85, 1997.

HO, P. L.; HO, P. FUNG, B. K.; IP, W. Y.; WONG, S. S.. A case of disseminated *Mycobacterium marinum* infection following systemic steroid therapy. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 33, n. 3, p. 232-233, 2001.

HONORÉ-BOUAKLINE, S.; VINCENSINI, J. P.; GIACUZZO, V.; LAGRANGE, P. H.; HERMANN, J. L.. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and extration. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2323-2329, 2003.

HORSBURGH, C. R. Jr.; GETTINGS, J.; ALEXANDER, L. N.; LENNOX, J. L.. Disseminated *Mycobacterium avium* complex disease among patients infected with human immunodeficiency virus, 1985-2000. **Clin. Infect Dis.**, v. 33, n. 11, p. 1938-1943, 2001.

INDERLIED, C. B.; KEMPER, C. A.; BERMUDEZ, L. E.. The *Mycobacterium avium* complex. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n.3, p. 266-310, 1993.

KANATHUR, N.; SHANTAVEERAPA, H. N.; BYRD, R. P. Jr.; MEHTA, J. B.; ROY, T. M.. Nontubercular mycobacterial pulmonary infection in immunocompetent men. **South Med. J.**, v. 94, n. 7, p. 719-723, 2001.

KENT, L.; McHUGH, T. D.; BILLINGTON, O.; DALE, J. W.; GILLESPIE, S. H.. Demonstration of homology between IS6110 tuberculosis and DNAs of other *Mycobacterium spp.* **Journal of Clinical Microbiology**. V. 33, n. 9, p. 2290-2293, 1995.

KIM, B. J.; HONG, S. K.; LEE, K. H.; YUN, Y. J.; KIM, E. C.; PARK, Y. G.; BAI, G. H.; KOOK, Y. H.. Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). **Journal of Clinical Microbiology**. V. 42, n. 3, p. 1308-1312, 2004.

KONEMAN, E.W; WINN, W. JR.; STEPHEN, A.; *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 2ª edição. São Paulo: Editora Panamericana, 1993. cap.12, p. 487-536.

KONEMAN, E.W; WINN, W. JR.; STEPHEN, A.; *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5ª edição. São Paulo: Editora MEDSI, 2001. cap.17, p. 903-963.

KOX, L.F.F.; RIEENTHONG, D.; MEDO, A. M.; UDOMSANTISUK, N.; ELLIS, K.; LEEUWEN, F.; HEUSDEN, S.; KUJIPER, S.; KOLK, A. H. J.. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 1994.

KRITSKI, A. L.; ROSETTI, M.L.; BONFIM, G.; CASTELO, A.; MELLO, F. C. Q.. Reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. **Jornal de Pneumologia**, v. 23, n.1, p.33-42, 1997.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M. B.; MUZY DE SOUZA, G.R.. **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria**. 2ªed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. cap. 5, p. 41-58.

KRONBAUER, A. L.; DIAS, C.; D'AZEVEDO, P. A.. Diagnóstico laboratorial da tuberculose: revisão dos métodos diagnósticos atuais. **Revista AMRIGS**, v. 40, n. 3, p. 159-165, 1996.

KULLAVANIJAYA, P.; RATTANA-APIROMYAKIJ, N.; SUKONTHAPIROM-NAPATTALUNG, P.; SIRIMACHAND, S.; DUANGDEEDEN, I.. Disseminated *Mycobacterium chelonae* cutaneous infection: recalcitrant to combined antibiotic therapy. **J. Dermatol.**, v. 30, n. 6, p. 485-491, 2003.

LAMB, S. R.; STABLES, G. I.; MERCHANT, W.. Disseminated cutaneous infection with *Mycobacterium chelonae* in a patient with steroid-dependent rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 29, n. 3, p. 254-257, 2004.

LEITE, C. Q. F.; TELAROLLI JUNIOR, R.. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.18, n. 1, p. 17-28, 1997.

LUNA, J. A. C.. Micobactérias atípicas. **BSCP Can. Ped.**, v. 25, n. 2, p. 237-248, 2001.

MARCH, M. F. B. P.. Tuberculose: histórico. In: SANT'ANNA, C. C. **Tuberculose na infância e na adolescência**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002, cap. 1, p. 1-3.

MARTINEZ, T.; CREAGH, R.; SAAVEDRA, J. M.; MERINO, D.. *Mycobacterium kansasii* osteomyelitis in a patient infected by the human immunodeficiency virus. **Enferm. Infecç. Microbiol. Clin.**, v. 18, n. 3, p. 148-149, 2000.

MARTIRE, T. M.. Métodos rápidos de diagnóstico. In: SANT'ANA, C.C. **Tuberculose: na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu, 2002. cap. 11, p. 95-109.

McHUGH, T. D.; NEWPORT, L. E.; GILLESPIE, S. H.. IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1769-1771, 1997.

MIYAZAKI, Y.; KOGA, H.; CONOS, S.; KAKU, M.. Nested polimerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2228-2232, 1993.

MOLTENI, C.; GAZZOLA, L.; CESARI, M.; LOMBARDI, A.; SALERNO, F.; TORTOLI, E.; CODECASA, L.; PENATI, V.; FRANZETTI, F.; GORI, A.. *Mycobacterium lentiflavum* infection in immunocompetent patient. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 119 – 122, 2005.

MONTESSORI, V.; PHILLIPS, P.; MONTANER, J.; HALEY, L.; CRAIB, K.. Species distribution in human immunodeficiency virus related mycobacterial infections: implications for selection of initial treatment. **Clin. Infect Dis.**, v. 22, n. 6, p. 989-992, 1996.

MORAES, R.; FIGUEIRA, C. M.; SECCO, E.; SILVA, M. G.; FONSECA, L. S.. Determinação da concentração mínima inibitória de oito quimioterápicos para cepas do complexo *M. avium* isoladas de pacientes portadores de SIDA no Brasil. **J. Pneumol.**, v. 22, n. 5, p. 247-250, 1996.

MORRONE, N.; CRUVINEL, M. C.; MORRONE, N. Jr.; FREIRE, J. A. S.; OLIVEIRA, L. M. L.; GONCALVES, C.. Pneumopatia causada por *Mycobacterium kansasii*. **J. Pneumol.**, v. 29, n. 6, p. 341-349, 2003.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A.. **Microbiologia médica**. 3ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. cap.40, p. 266-275.

NAVA, O.; PRIETO, L.. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis pulmonar (revisión). **Kasmera**, v. 29, n. 1, p. 51-63, 2001.

NIEMANN, S.; RÜSCH-GERDES, S.; RICHTER, E.. IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.12, p.3015-3020, 1997.

NOGUEIRA, P. A.; ABRAHÃO, R. M. C. M.; MALUCELLI, M. I. C.. Análises dos resultados de exames de escarros, provenientes de unidades de saúde, hospitais e presídios do município de São Paulo, para o diagnóstico da tuberculose. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 9, n. 4, p.263-271, 2000.

NOLTE, F. S.; METCHOCK, B.; MCGOWAN, J. E. Jr.; EDWARDS, A.; OKWUMABUA, O.; THURMOND, C.; MITCHEL, P. S.; PLIKAYTIS, B.. Direct detection of *Micobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and

DNA hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1777-1782, 1993.

NUNEZ, F, M. J.; OJEA DE CASTRO, R.; ANIBARRO, G. L.; PASCUAL, D. A.. Disseminated infection by *Mycobacterium scrofulaceum* in an infected HIV patient. **An. Med. Interna**, v. 19, n. 7, p. 381-382, 2002.

OLIVEIRA, M. E. M.; SEVERO, L. C.; FILHO, J. R. H.; RIZZON, C. F. C.; PICON, P. D.. Tuberculose Osteoarticular. **Rev. AMRIGS**, v. 25, n.5, p. 299-305, 1981.

OMS / WHO Report – Global Tuberculosis Control – Surveillance, Planning, Financing. 2002. Disponível em <http://www.who.org>.

OPLUSTIL, C. P.; SINTO, S. I.; MARTINS, M.; MENDES, C. M. F.. Avaliação de um novo sistema para detecção de micobactérias: “*Mycobacterium* Growth Indicator Tube” (MGIT). **J. Bras. Patol.**, v. 33, n. 2, p. 70-75, 1997.

OPLUSTIL, C.O.; ZOCCOLI, C.M; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I.. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000. 254p.

PAO, C. C.; YEN, B.; YOU, J.; MAA, J.; FISS, E. H.; CHANG, C.. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1877-1880, 1990.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; AIRES, E. M.; MOREIRA, I. M.; BOSZCZOWSKI, I.; CAMPÊAS, A E.; FILHO, A M. B.. Micobacteriose disseminada por *M. kansasii* associada à AIDS: relato de caso. **Rev. Panam. Infectol.**, v. 6, n. 3, p. 51-54, 2004.

PARRA, C. A.; LONDOÑO, L. P.; DEL PORTILLO, P.; PATARROYO, M. E.. Isolation, characterization, and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: identification of a species-specific sequence. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3411-3417, 1991.

PFYFFER, G. E.; KISSLING, P.; JAHN, E. M. I.; WELSCHER, H. M.; SALFINGER, M.; WEBER, R.. Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 834-841, 1996.

PHOA, L. L.; KONG, K. S.; THAMBOO, T. P.; LAM, K. N.. A case of *Mycobacterium scrofulaceum* osteomyelitis of a right wrist. **Ann. Acad. Med. Singapore**, v. 29, n. 5, p. 678-681, 2000.

PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.; CARDOZO, A. S.; FERREIRA, R. L. T.; PICON, M. I. X.. In: PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.; OTT, W. O.. **Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993. cap. 21, p. 453-466.

PIERRE, C.; LECOSSIER, D.; BOUSSONGANT, Y.; BOCART, D.; JOLY, V.; YENI, P.. Use of reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification. . **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 712-717, 1991.

PRISSICK, F. H.; MASSON, A. M.. Cervical lymphadenitis in children caused by chromomogenic mycobacteria. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 75, n. 10, p. 798-803, 1956.

RAVIGLIONE, M. C., O'BRIEN, R. J.. Doenças infecciosas: tuberculose. In: FAUCI, A. S., BRAUNWALD, E., ISSELBACHER, K. J.; *et al.*. **Harrison medicina interna**. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill, 1998, v. 1, cap. 171, p. 1074-1085.

RAVIGLIONE, M. C; SNIDER, D. E.; KOCHI, A.. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA.**, v. 273, p. 220-226, 1995.

RAZAVI, B.; CLEVELAND, M. G.. Cutaneous infection due to *Mycobacterium kansasii*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 38, n. 3, p. 173-175, 2000.

REQUEJO, H. I. Z.. Diagnóstico laboratorial da tuberculose e outras micobacterioses. **Laes&Haes**, v. 128, p.128-160, 2001.

RIBERA, E.; MARTINEZ-VASQUEZ, J. M.; OCAÑA, I., SEGURA, R. M.; PASCUAL, C.. Activity of adenosine deaminase in cerebrospinal fluid for the diagnosis and follow-up of tuberculous meningitis in adults. **J. Infect. Dis.**, v. 155, n. 4, p. 603-607, 1987.

RIZZON, C. F. C.; OTT, W. O.. **Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993. cap. 8, p.227-246.

RIZZON, C. F. C.; PICON, P. D.; SEVERO, L. C.; SCHWANTES, I.; STRALIOTTO, S. M.. Micobactérias atípicas. In: PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.; OTT, W. O. **Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993. cap. 29, p. 607-617.

ROSALES, E. P.. Diagnostico de infecciones con técnicas de biología molecular. **Bol. Escuela Med. Pontificia universidad católica de Chile**, v. 26, p. 173-176, 1997.

ROSEMBERG, J.. Repercussões da biologia molecular na tuberculose. **Jornal de Pneumologia**, v. 19, n.1, p.25-36, 1993.

ROSSETTI, M. L.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S.. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Rev. Saúde Pública*, v. 36, n. 4, p. 525-532, 2002.

ROTH, A.; FISCHER, M.; HAMID, M. E.; MICHALKE, W. L.; MAUCH, H.. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S r RNA gene internal transcribed spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 139-147, 1998.

ROTH, A.; REISCHL, U.; STREUBEL, A.; NAUMANN, L.; KROPPESTEDT, R. M.; HABICHT, M.; FISCHER, M.; MAUCH, H.. Novel diagnostic for identification of micobacteria using genus-specific amplification of the 16S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1094-1104, 2000.

RUFFINO-NETO, A.. Programa de controle da tuberculose no Brasil: situação atual e novas perspectivas. **Informe Epidemiológico do SUS**. v. 10, n. 3, p.12-138, 2001.

RUFFINO-NETO, A.. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n.1, p. 2002.

SAADATMAND, B.; POULTON, J. K.; KAUFFMAN, C. L.. *Mycobacterium marinum* with associated bursitis. **J. Cutan. Med. Surg.**, v. 3, n. 4, p. 218-220, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989. v. 1, cap. 6, p. 6.2-6.3.

SANDERS, J. W.; WALSH, A. D.; SNIDER, R. L.; SAHN, E. E.. Disseminated *Mycobacterium scrofulaceum* infection: a potentially treatable complication of AIDS. **Clin. Infect Dis.**, v. 20, n. 3, p. 549, 1995.

SCHUTZBANK, T. E.; STERN, H. J.. Princípios e aplicações da reação da cadeia de polimerase. **Rev. Brás. Anal. Clín.**, v. 25, n. 4, p. 112-118, 1993.

SEVERO, L. C. Diagnóstico laboratorial das micobacterioses. In: PICON, P. D.; SEVERO, L. V.; FERREIRA, R. L. T.; GIUSTINA, M. L.; HORN, C.L.; WOLFFENBUTTEL, I.. Micobacteriose e SIDA (AIDS). In: PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.; OTT, W. O.. **Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993. cap. 30, p. 619-630.

SHANKAR. P.; MANJUNATH, N.; MOHAN, K. K.; PRASAD, K.; BEHARI, M.; AHUJA, G. K.. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. **The Lancet**, v. 337, p. 5-7, 1991.

SHRESTHA, N. K.; TUOHY, M. J.; HALL, G. S.; UDO, R.; GORDON, S. M.; PROCOP, G. W.. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 1, p. 5121-5126, 2003.

SILVA, A. M. M.; MARTINS, C. T. B.; FERRABOLI, R.; JORGETTI, V.; ROMÃO Jr, J. E.. Revisão/Atualização em diálise: água para hemodiálise. **J. Bras. Nefrol.**, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.

SILVA, E. A. M.; MIRANDA, J. B. N.; FERRAZOLI, L.; ALGE, M. E.; SILVA, R. R. F.; FUZIHARA, T. O.; PALACI, M.. Ocorrência de infecções pulmonares devidas ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 47, n.1/2, p. 11-17, 1987.

SITNIK, R.; PINHO, J. R. R.. Princípios básicos das técnicas de biologia molecular utilizadas em laboratórios clínicos. **NewsLab**, ano IV, n.19, 124-129, 1996.

SOINI, H.; SKURNIK, M.; LIPPO, K.; TALA, E.; VILJANEN, M.. Detection and identification of mycobacteria of a segment of the gene coding for 32-kilodalton protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 8, p. 2025-2028, 1992.

SOLÉ, D.. Imunidade e hipersensibilidade. In: SANT'ANA, C.C. **Tuberculose: na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu, 2002. cap. 4, p. 29-33.

SRITHARAN, V.; BARKER, R. H.. A simple method for diagnosing *M. tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. **Molecular and cellular probes**, v. 5, p. 385-395, 1991.

STEFFAN, N.; RÜSCH-GERDES, S.; RICHTER, E.. IS6110 fingerprint of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Germany during 1995. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 12, p. 3015-3020, 1997.

TAKEWAKI, S.; OKUZUMI, K.; ISHIKO, H.; NAKAHARA, K.; OHKUBO, A.; NAGAI, R.. Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and species-specific oligonucleotide probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 446-450, 1993.

TARASCONI J. C.; PICON, P. D.; PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C. Tuberculose pericárdica. In: PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.; OTT, W. O.. **Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública**. Rio de Janeiro: Editora MEDSI, 1993. cap. 14, p. 357-365.

THIBERT, L.; LEBEL, F.; MARTNEAU, B.. Two cases of *Mycobacterium haemophilum* infection in Canadá. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 621-623, 1990.

THIERRY, D.; BRISSON-NOËL, A.; VINCENTE-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J. L.; GICQUEL, B.. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2668-2673, 1990.

TIMERMAN, A.. Micobactérias não-tuberculosas e doenças associadas. In: VERONESI, R.. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: GUANABARA-KOOGAN, 1993. cap. 43, p. 344-348.

VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D.. A case of disseminated *Mycobacterium marinum* infection in an immunocompetent patient. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.**, v. 11, n. 10, p. 908-911, 1992.

WATT, G.; ZARASPE, G.; BAUTISTA, S.; LAUGHLIN, L. W.. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay to detect mycobacterial antigen and antibody in cerebrospinal fluid. **J. Infect. Dis.**, v. 158, n. 4, p. 681-686, 1988.

WILKINS, E. G. L.; IVANYI, J.. Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **The Lancet**, v. 336, p. 641-644, 1990.

WILSON, K. H.; BLITCHINGTON, R. B.; GREENE, R. C.. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1942-1946, 1990.

WOLINSKY, E.. Doenças causadas por micobactérias: tuberculose. In: WYNGAARDEN, J. B., SMITH, L. H. Jr., BENNETT, J. C.. **Cecil tratado de**

**medicina interna**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1993, v.2, cap. 20, p. 1770-1779.

WOLINSKY, E.. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 1992.

WOODS, G. L.. Micobactérias. In: HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19ª edição. São Paulo: Editora Manole, 1999. cap. 51, p. 1194-1209.

YUEN, L. K. W.; ROSS, B. C.; JACKSON, K. M.; DWYER, B.. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from vietnamese patients by southern blot hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1615-1618, 1993.

ZHIBANG, Y.; BIXIA, Z.; QISHAN, L.; LIHAO, C.; XIANGQUAN, L.; HUAPING, L.. Large-scale outbreak of infection with *Mycobacterium chelonae* abscessus after penicillin injection. **J. Clin. Microbial.**, v. 40, n. 7, p. 2626-2628, 2002.

## APÊNDICE – A (reagentes, soluções e meios de cultura)

### 1 Soluções empregadas na coloração de Ziehl-Neelsen

#### 1.1 Solução de fucsina fenicada à 1,0%

Fucsina básica ..... 1 g  
Álcool à 95° (comercial)..... 100 mL

- Dissolver por agitação a fucsina no álcool e adicionar 55 mL de fenol aquoso e água quente destilada quente até completar 1.000 mL;
- Deixar repousar por 24 horas;
- Filtrar e estocar em frasco âmbar.

#### 1.2 Solução de fenol aquoso

Fenol cristalizado ..... 1 g  
Água destilada ..... 100 mL

- Aquecer em banho-maria até completar dissolução. Deixar solidificar.

#### 1.3 Solução de azul de metileno à 0,1%

Azul de metileno ..... 1 g  
Álcool à 95° (comercial)..... 100 mL

- Dissolver por agitação e juntar água destilada quente até completar um litro;
- Deixar repousar por 24 horas, filtrar e estocar em frasco âmbar.

## 1.4 Solução descorante

Ácido clorídrico P.A .....	30 mL
Álcool à 95° (comercial).....	970 mL

- Com uma pipeta deixar escorrer o ácido clorídrico pelas paredes do frasco contendo o álcool e agitar suavemente.

## 2 Meio de cultura empregado na cultura de micobactérias

### 2.1 Meio de Lowenstein-Jensen

Meio básico de Lowenstein-Jensen.....	18,6 g
Glicerina bidestilada.....	6 mL
Água destilada qsp.....	300 mL
Ovos de galinha homogeneizados.....	500 mL

- Pesar 18,6g de meio básico de Lowenstein-Jensen e adicionar 6 mL de glicerina bidestilada;
- Adicionar água destilada para completar um volume de 300 mL;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Tomar duas dúzias de ovos de galinha frescos, lavar bem com água e sabão, e imergir durante 15 minutos em álcool a 70°;
- Quebrar os ovos assepticamente num Becker estéril, agitar com uma batedeira estéril e filtrar em quatro camadas de gaze estéril;
- Retirar o meio do autoclave , esperar atingir uma temperatura de 60°C;
- Adicionar 500 mL de ovos batidos estéreis. Misturar bem;
- Distribuir em tubos e deixar coagular em posição inclinada em estufa a 90°C;
- Incubar por 48 horas a 37°C para comprovar a esterilidade;
- Proteger contra a evaporação e conservar em geladeira;
- Válido por um ano após o preparo.

### 3 Reagentes e soluções empregadas para a extração do DNA micobacteriano

#### 3.1 Tampão Tris 10mM EDTA 1mM – Triton 1% (Tampão TE)

Tris Base (Merck) .....	1,211 g
EDTA (Reagen) .....	0,372 g
Triton X-100 (Beckman) .....	10 mL

- Dissolver Tris Base e EDTA em 800mL de água destilada, ajustar o pH final para 8,0 com HCl (Reagen);
- Adicionar 10 mL de Triton X-100;
- Completar para 1000 mL com água destilada;
- Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 minutos.

#### 3.2 Tampão fosfato pH 6,8

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Reagen) (solução 1M) .....	49,7 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Reagen) (solução 1M). .....	50,3 mL

- Completar para 100 mL de água destilada;
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

## 4 Reagentes e soluções empregadas na amplificação do DNA micobacteriano

### 4.1 Diluição das soluções estoque dos iniciadores

#### a) Iniciadores para o gênero *Mycobacterium*

- Primer forward (up) com uma concentração estoque de 100 pM, sendo diluído para uma concentração final de 10 pM.

5  $\mu\text{L}$  de solução de estoque de primer

45  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril

- Primer reverse (low) com uma concentração estoque de 100 pM, sendo diluído para uma concentração final de 10 pM.

5  $\mu\text{L}$  de solução de estoque de primer

45  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril

#### b) Iniciadores para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*

- Primer forward (up) com uma concentração estoque de 58,79  $\mu\text{M/L}$ , sendo diluído para uma concentração final de 7,5  $\mu\text{M/L}$ .

12,75  $\mu\text{L}$  de solução estoque de primer

87,84  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril

- Primer reverse (low) com uma concentração estoque de 33,99  $\mu\text{M/L}$ , sendo diluído para uma concentração final de 7,5  $\mu\text{M/L}$

22,06  $\mu\text{L}$  de solução estoque de primer

77,93  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril

### 4.2 Tampão (10x) 15 mM $\text{MgCl}_2$

**4.3 Oligonucleotídeos** (dNTP)(Amersham Pharmacia) com uma concentração estoque de 100mM, sendo diluído para uma concentração final de 2,5 mM.

2,5 µL de solução estoque de cada oligonucleotídeo, totalizando 10 µL

90 µL de água destilada estéril

**4.4 Dimetil sulfóxido** (DMSO)(Reagen) pronto para ser utilizado no mix de reação da PCR.

## 5 Reagentes empregados na eletroforese

### 5.1 Tampão Tris Borato EDTA (solução estoque) – TBE 10X

Tris Base (Merck) .....	60,5 g
Ácido Bórico (Merck) .....	30,91 g
EDTA (Reagen) .....	9,30 g

- Dissolver em 300 mL de água destilada, ajustar o pH final para 8,0 com HCl (Reagen);
- Completar para 500 mL de água destilada;
- Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 minutos.

### 5.2 Tampão Tris Borato EDTA (solução de uso) – TBE 1X

Tampão TBE 10x.....	20 mL
Água destilada .....	180 mL

### 5.3 Gel de agarose 1,2%

Agarose (Gen-Apex).....	0,6 g
TBE 1X.....	50 mL

- Pesar 0,6 g de agarose (Gen-apex);
- Dissolver em 50 mL de TBE 1x;

- Dissolver a mistura em manta aquecedora, agitando com frequência e verificando se não há fragmentos íntegros de agarose;
- Esfriar a mistura até temperatura aproximada de 60°C;
- Adicionar 2,5 µL de Brometo de etídio (10 mg/dL) (Sigma);
- Colocar a agarose na bandeja de eletroforese previamente vedada e com o pente que formará os pocinhos onde serão colocadas as amostras;
- Deixar esfriar;
- Preparar 300 mL de TBE 1x para cobrir o gel de agarose na cuba de eletroforese.
- Adicionar 3µL de brometo de etídio ao TBE 1X, no lado oposto aos poços de aplicação das amostras. O brometo de etídio migra em direção ao ânodo.

#### 5.4 Tampão de carregamento (Loading buffer)

Bromofenol azul (Sigma) .....	0,025 g
Xileno cianol (Sigma) .....	0,025 g
Ficoll 400 (Sigma) .....	1,5 g

- Dissolver em 10 mL de água destilada.
- Acrescentar o tampão de carregamento (Bromofenol azul 0,25%; Xileno cianol 0,25%, Ficoll 400 15%) em uma proporção de 1:4 do volume final da amostra.

## **APÊNDICE - B (técnicas)**

### **1 Método de coloração de Ziehl-Neelsen**

- Centrifugar amostra a 3.000 ×g por 15 minutos;
- Desprezar o sobrenadante e homogeneizar, e com alça bacteriológica depositar uma gota do sedimento na lâmina;
- Secar a lâmina dentro da cabine de segurança e fixar o esfregaço no calor antes de corar.
- Cobrir o esfregaço com fucsina de Ziehl;
- Aquecer a parte inferior da lâmina com a chama do bico de Bunsen até observar a emissão de vapores, repetir por 3 vezes;
- Lavar com água corrente;
- Cobrir o esfregaço com álcool-ácido e deixar por 1 minuto, descorando ao máximo;
- Lavar em água corrente;
- Cobrir o esfregaço com azul de metileno e deixar por 2 minutos;
- Lavar em água corrente;
- Deixar secar ao ar.

### **5 Cultivo em meio de Lowenstein-Jensen**

- Inocular de 1 a 2 mL da amostra no meio;
- Incubar a 37°C, deixando os tubos inclinados em ângulo de 45° com as tampas semi-abertas até o meio absorver o inóculo (por uma semana);
- Os tubos devem ser examinados nas primeiras 48 horas para a verificação a verificação da secagem do inóculo e quanto à presença de contaminação, sendo que a cor esbranquiçada indica alcalinização e a cor verde intensa indica acidificação;
- Fazer leituras semanais por até 60 dias, informando os resultados das culturas positivas, descartando os tubos e relatando aspecto (forma, cor) e quantidade de colônias crescidas.

## **6 Técnica de extração do DNA micobacteriano**

- Centrifugar a amostra à 4.300 xg por 15 minutos;
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 1 mL de tampão fosfato pH 6,8;
- Centrifugar à 12.600 xg por 5 minutos;
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 1 mL de TE-Triton X-100;
- Centrifugar à 12.600 xg por 5 minutos;
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 150 µL de TE-Triton X-100;
- Ferver a 100°C por 30 minutos;
- Centrifugar à 12.600 xg por 3 minutos;
- Retirar e armazenar o sobrenadante (DNA extraído) a 4°C;
- Utilizar 5-25 µL do DNA extraído na reação de PCR.