



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
MÉDICA

BRÁULIO MATIAS DE CARVALHO

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E PERFIL DE RESISTÊNCIA  
ÀS DROGAS ANTI-TUBERCULOSE EM PACIENTES CO-  
INFECTADOS COM MICOBACTÉRIAS E HIV EM  
HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA, CEARÁ.

FORTALEZA-CE

2007

BRÁULIO MATIAS DE CARVALHO

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E PERFIL DE RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTI-TUBERCULOSE EM PACIENTES CO-INFECTADOS COM MICOBACTÉRIAS E HIV EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA, CEARÁ.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

FORTALEZA  
2007

C321e Carvalho, Bráulio Matias de

Estudo epidemiológico e perfil de resistência às drogas anti-tuberculose em pacientes co-infectados com micobactérias e HIV em hospital de referência em Fortaleza, CE/ Bráulio Matias de Carvalho. 2007.

163 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro  
Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará.  
Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2007.

1. HIV. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Tuberculose. 4. Fatores de Risco. 5. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida.  
I. Grangeiro, Thalles Barbosa (Orient.). II. Título.

CDD 616.9792

BRAÚLIO MATIAS DE CARVALHO

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E PERFIL DE RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTI-TUBERCULOSE EM PACIENTES CO-INFECTADOS COM MICOBACTÉRIAS E HIV EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA, CEARÁ.

BRAÚLIO MATIAS DE CARVALHO

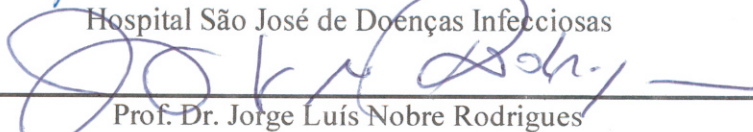
Dissertação submetida a Coordenação do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Microbiologia Médica.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto  
Hospital São José de Doenças Infecciosas

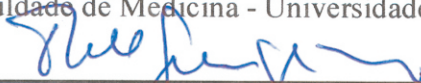


Prof. Dr. Jorge Luís Nobre Rodrigues  
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará



Prof. Dra. Valéria Góes Ferreira Pinheiro  
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho (suplente)  
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Thaltes Barbosa Grangeiro (orientador)  
Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica - Universidade Federal do Ceará

À minha família, pelos sólidos ensinamentos e pelo amor irrestrito, ao meu filho e à minha noiva Keyla Harten, por serem luz e inspiração, e aos sinceros amigos que acreditaram neste sonho.

## AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, representado pelos professores e demais funcionários, pela receptividade, pelos preciosos ensinamentos e pela dedicação para a formação científica dos seus alunos.

À Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota, pela orientação e dedicação em todos os momentos das pesquisas, pela atenção, compreensão e exemplos primordiais para a minha formação humana e profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pelos ensinamentos, pela orientação, pela atenção e por me ensinar a arte da persistência, tão essencial aos pesquisadores.

Ao Prof. André Jales Monteiro, pelos conselhos e ensinamentos estatísticos em nossas longas conversas, e pela análise dos dados desta dissertação.

À farmacêutica Creusa Lima Campelo, pela ajuda na realização dos testes de sensibilidade, pelo incentivo e por me transmitir todo seu amor e entusiasmo pelo trabalho para o controle da tuberculose.

Ao Dr. Roberto da Justa Pires Neto, por ter incitado a realização desta pesquisa e por toda ajuda dispensada.

À farmacêutica Elicélia Alencar de Góes e à Maria Vânia Freitas Gonçalves pela inestimável colaboração no processamento e cultivo das amostras.

À Dra. Sílvia Cardoso Leão e à Dra. Maria Alice da Silva Teles, pelo treinamento técnico para a realização do PRA.

À todos do Hospital São José de Doenças Infecciosas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas mestrandos Mariana Moura Fé, Jacó Mesquita, Sílvia Donato, Theodora Thays Prado Arruda, Rafaela Peixoto de Araújo, pela amizade e colaboração durante todos os momentos do mestrado.

Aos amigos Alexandre Rocha Matos Júnior, Jones Barbosa Lima, Tuana Oliveira Correia, Cristiane Souza Bezerra e Francisca Mônica Sousa Café pela amizade, pela disponibilidade e pela ajuda técnica na realização das etapas da identificação molecular.

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.*

(John Kennedy)

## RESUMO

A infecção pelo vírus HIV e a TB estão entre as principais causas de morte por agentes infecciosos no mundo, aproximadamente 13 milhões de pessoas estão infectadas com ambos agentes causadores. Os indivíduos infectados pelo HIV apresentam susceptibilidade aumentada para tuberculose ativa, sendo a imunossupressão determinada pelo vírus o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença tuberculose. Este trabalho investigou o perfil de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* e os fatores epidemiológicos relacionados ao desenvolvimento da doença em pacientes co-infectados pelo HIV atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ), o qual é referência em doenças infecciosas em Fortaleza, Estado do Ceará, Brasil. Foram analisados, no período de julho de 2003 até junho de 2006, 208 pacientes com diagnóstico clínico e/ou laboratorial de micobacteriose ou tuberculose e infecção pelo HIV atendidos no HSJ. Os pacientes co-infectados TB/HIV apresentavam idade superior aos pacientes do grupo controle (média de 40 anos,  $p=0,0025$ ), tendo aproximadamente 4 anos a mais. O sexo masculino apresentou maioria significativa (80,8%,  $p=0,0005$ ) e teve risco 43,0% superior ao sexo feminino de desenvolver TB. O risco de adquirir TB foi duas vezes maior nos pacientes com escolaridade baixa, que representavam 85,9% dos pacientes ( $p=0,000$ ). A história de contato prévio com pacientes com TB e de tratamento prévio para TB foram considerados fatores de risco para TB nesta população. O nível de imunossupressão foi maior nos pacientes co-infectados TB-HIV com contagem média de linfócitos T CD4+ de 169 cels/mm<sup>3</sup> ( $p=0,000$ ), assim como o logaritmo da carga viral com média de 4,36 ( $p=0,0013$ ). As formas clínicas mais freqüentes foram: pulmonar (45,7%), extrapulmonar (28,4%) e disseminada (25,9%). Das amostras que foram realizadas identificação, 81,2% foram identificadas como *M. tuberculosis* e 12,8% como não *M. tuberculosis*. A freqüência de resistência a uma droga e multi-resistência foram iguais (5,9%). Esses resultados fornecem informações importantes para o estabelecimento de estratégias de políticas de saúde públicas mais adequadas a nível regional.

Palavras-chave: HIV. *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculose. Fatores de Risco. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida.

## ABSTRACT

The HIV infection and the tuberculosis (TB) are together the main causes of death for infectious agents in the world, being approximately 13 million people infected with both causative agents. The HIV-infected individuals show increased susceptibility for active tuberculosis, being the immunosuppression caused by the virus the main risk factor for the development for active TB. This study investigated the profile of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance and evaluated the factors related to the development of TB in HIV infected patients who were treated at HSJ, which is a reference hospital in infectious diseases in Fortaleza, Ceará, Brazil. During the period of July 2003 until June 2006, 208 patients with clinical and/or laboratorial diagnosis of micobacteriosis or tuberculosis and infection for the HIV were taken care in this hospital. The TB/HIV co-infected patients were older (average: 40 years,  $p= 0.0025$ ) than the control group, being approximately 4 years older. The majority of the patients were male (80.8%,  $p= 0.0005$ ) and they had shown a risk to develop TB of 43.0% greater compared to the female sex. The risk to develop the TB disease was two times higher in the patients with lower educational levels (less than eight years of schooling) and they represented 85.9% of the patients ( $p=0.000$ ). The history of previous contact with TB patients and previous treatment for TB were also found to be risk factors for TB. The immunosuppression level was higher in TB-HIV co-infected patients being the CD4+ lymphocytes count average of 169 cells/mm<sup>3</sup> ( $p=0.000$ ) and the viral load logarithm average of 4,36 ( $p=0.0013$ ). The clinical forms most frequents were pulmonary (45.7%), extrapulmonary (28.4%) and disseminated (25.9%). Of the samples that were submitted to identification, 81.2% were *M. tuberculosis* and 12.8% were not *M. tuberculosis*. The resistance frequency to one drug and multi-resistance were the same (5.9%). Overall, these observations are important for establishing political strategies of public health to improve the conditions at the regional level.

Keywords: HIV. *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. Risk Factors. Acquired Immunodeficiency Syndrome.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>AD</b>	<i>Anno Domini</i> (em latim: no ano do Senhor)
<b>MTBC</b>	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MOTT</b>	<i>Mycobacteria Other Than the Mycobacterium tuberculosis complex</i>
<b>NTM</b>	<i>Non-tuberculosis mycobacteria</i>
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>ICAM-3</b>	<i>Intercellular Adhesion Molecule-3</i>
<b>DC-SIGN</b>	<i>C-type lectin receptor</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>NF-κB</b>	Fator Nuclear κB
<b>TACO</b>	<i>Tryptofan aspartate-containing coat</i>
<b>MHC-II</b>	Complexo de histocompatibilidade maior classe II
<b>IL-12</b>	Interleucina - 12
<b>IL-18</b>	Interleucina - 18
<b>IL-10</b>	Interleucina - 10
<b>IL-2</b>	Interleucina – 2
<b>IFN-γ</b>	Interferon gama
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintetase
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>PGRS</b>	Seqüência polimórfica rica em G + C
<b>ORF</b>	<i>Open reading frames</i>
<b>LJ</b>	Löwenstein-Jensen
<b>PNB</b>	Ácido p-nitrobenzoato ou Ácido para-nitrobenzóico
<b>TCH</b>	Ácido 2-tiofenocarboxílico
<b>TLC</b>	Cromatografia de camada fina
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta performance
<b>GLC</b>	Cromatografia gás-líquido

<b>PRA</b>	<i>PCR-restriction endonuclease analysis</i>
<b>PCR</b>	Reação de polimerase em cadeia ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>ITS</b>	<i>Internal transcribed spacer</i>
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucléico ribossômico
<b>PAS</b>	Ácido para-aminosalicílico
<b>H</b>	Isoniazida
<b>R</b>	Rifampicina
<b>Z</b>	Pirazinamida
<b>E</b>	Etambutol
<b>S</b>	Estreptomicina
<b>Et</b>	Etionamida
<b>MDR-TB</b>	Tuberculose multirresistente às drogas
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Humana
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Humana
<b>HAART</b>	<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>
<b>ARV</b>	Antiretrovirais
<b>MDR</b>	<i>Multidrug-resistant</i>
<b>HSJ</b>	Hospital São José de Doenças Infecciosas
<b>PPD</b>	Derivado protéico purificado
<b>TSA</b>	Teste de sensibilidade antimicrobiana
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EIA</b>	<i>Enzyme Immuno Assay</i>
<b>MEIA</b>	<i>Microparticle Enzyme Immuno Assay</i>
<b>NASBA</b>	<i>Nucleic Acid Sequence Based Amplification</i>
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>BAAR</b>	Bacilos álcool-ácido resistentes
<b>NALC</b>	N-acetil-L-cisteína
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>LACEN</b>	Laboratório Central do Estado do Ceará
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>ufc</b>	Unidades formadoras de colônias

<b>ADC</b>	<i>Albumin Dextrose Catalase</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dATP</b>	<i>2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate</i>
<b>dGTP</b>	<i>2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate</i>
<b>dCTP</b>	<i>2'-deoxycytidine 5'-triphosphate</i>
<b>dUTP</b>	<i>2'-deoxyuridine 5'-triphosphate</i>
<b>TBE</b>	Tris-borato-EDTA
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>A</b>	Adenosina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanidina
<b>T</b>	Timidina
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>RR</b>	Risco Relativo
<b>HLA</b>	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
<b>RFLP</b>	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
<b>MIRU</b>	<i>Mycobacterial interspersed repetitive units</i>
<b>VNTR</b>	<i>Variable numbers of tandem repeats</i>
<b>TARV</b>	Terapia antiretroviral
<b>MAC</b>	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura da parede celular das micobactérias.....	p. 21
FIGURA 2	Estimativa de taxas incidência de TB por países em 2004.....	p. 25
FIGURA 3	Taxas de prevalência de infecção pelo HIV no mundo .....	p. 33
FIGURA 4	Estimativa de prevalência de HIV em casos novos de TB em adultos em 2004.....	p. 37
FIGURA 5	Critérios de definição de caso de aids.....	p. 42
FIGURA 6	Algoritmo de identificação dos padrões de PRA.....	p. 52
FIGURA 7	Gráfico de distribuição de idades em anos entre os pacientes co-infectados e os controles .....	p. 54
FIGURA 8	Tempo de diagnóstico do HIV.....	p. 60
FIGURA 9	Gráfico de contagem de linfócitos T CD4+ (cels/mm <sup>3</sup> ) .....	p. 62
FIGURA 10	Gráfico de análise do logaritmo da carga viral .....	p. 63
FIGURA 11	Relação entre a contagem de linfócitos T CD4+ (cels/mm <sup>3</sup> ) e a reação ao PPD.....	p. 66
FIGURA 12	Foto de eletroforese em gel de agarose 4,5% mostrando os padrões do PRA das cepas submetidas à identificação ao nível de espécie.....	p. 68

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Esquemas de tratamento de tuberculose indicados no Brasil .....	p. 30
QUADRO 2	Drogas antituberculose e os genes envolvidos em suas resistências .....	p. 31
QUADRO 3	Concentrações das drogas empregadas no Método das Proporções .....	p. 47
QUADRO 4	Iniciadores da PCR .....	p. 49
QUADRO 5	Sítio de restrição das enzimas empregadas no PRA .....	p. 51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição dos pacientes quanto por sexo entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p. 55
TABELA 2	Distribuição dos pacientes quanto ao estado civil entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p. 55
TABELA 3	Distribuição de estado civil dos pacientes, comparando solteiros com não-solteiros entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p. 56
TABELA 4	Distribuição dos pacientes em relação à escolaridade (tempo de estudo em anos) entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p.56
TABELA 5	Distribuição dos pacientes quanto à renda mensal em salários mínimos entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p.57
TABELA 6	Descrição do comportamento dos grupos em relação ao tabagismo e etilismo.....	p.58
TABELA 7	Análise estatística da história de contactante domiciliar com TB, tratamento prévio e uso de quimioprofilaxia para TB entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p.59
TABELA 8	Análise do tempo de diagnóstico do HIV entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p.60
TABELA 9	Distribuição da classificação clínica dos pacientes estudados entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p.61
TABELA 10	Distribuição da classificação clínica dos pacientes estudados entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p.61
TABELA 11	Análise do uso de HAART entre os pacientes co-infectados e os controles.....	p.63
TABELA 12	Distribuição dos casos de TB de acordo com RX de tórax, PPD e análise microbiológica (cultura em Lowestein-Jensen e pesquisa de BAAR em lâmina) nos pacientes co-infectados com TB-HIV.....	p.64
TABELA 13	Relação entre o PPD e a forma clínica da tuberculose.....	p.66

TABELA 14	Análise do tempo de infecção pelo HIV, contagem de linfócitos CD4+ (cels/mm <sup>3</sup> ) e da carga viral plasmática (log) em relação à forma clínica da tuberculose .....	p.67
TABELA 15	Características epidemiológicas dos pacientes com micobacteriose atípica .....	p.69
TABELA 16	Características epidemiológicas dos quatro pacientes com isolados clínicos resistentes a drogas .....	p.70

## SUMÁRIO

1. Introdução:	18
1.1 O gênero <i>Mycobacterium</i>	18
1.2 Características e estrutura das micobactérias	19
1.3 Patogênese e resposta imune às micobactérias	21
1.3.1 Resposta imune inata	21
1.3.2 Resposta imune adquirida	22
1.4 Epidemiologia da tuberculose	23
1.5 Estrutura genômica do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
1.6 Métodos de identificação de micobactérias	26
1.6.1 Identificação fenotípica	26
1.6.2 Análise de ácidos micólicos	26
1.6.3 Identificação genotípica	27
1.6.3.1. PCR e análise com endonucleases de restrição	27
1.6.3.2. Sondas de DNA	27
1.6.3.3. Seqüenciamento de DNA	28
1.7 Tratamento da tuberculose	28
1.8 Tuberculose multirresistente	29
1.9 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	31
1.9.1 Epidemiologia do HIV	32
1.9.2 Manifestações clínicas da infecção pelo HIV	33
1.10 Co-infecção tuberculose e HIV	35
1.10.1 Ligação biológica	35
1.10.2 Epidemiologia da co-infecção tuberculose e aids	36
1.10.3 Tuberculose multirresistente	37
1.11 Importância do estudo:	38
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Materiais e métodos:	40
3.1 Tipo de estudo:	40
3.2 População de estudo:	40

3.3 Critério de inclusão e exclusão:	40
3.4 Definição de casos:	41
3.5 Outras definições:	43
3.6 Definição do controles:	45
3.7 Aspectos éticos:	45
3.8 Processamento e cultivo primário dos isolados clínicos:	45
3.8.1 Cultivo das amostras	46
3.9 Teste de sensibilidade a drogas antimicrobianas pelo Método das Proporções (CANETTI, 1963) (para <i>M. tuberculosis</i> ):	46
3.10 Identificação molecular:	47
3.10.1 Extração do DNA	48
3.10.2 PCR	49
3.10.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	50
3.11 Análise estatística:	53
4. Resultados	54
5. Discussão	71
5.1 Dados epidemiológicos populacionais:	72
5.2 Fatores diretamente relacionados à TB	75
5.3 Fatores relacionados à infecção pelo HIV	78
5.4 Diagnóstico da co-infecção micobacteriose-HIV	81
5.5 TB resistente às drogas	85
5.6 Perfil da micobacteriose não-tuberculose	87
6. Conclusão	89
7. Bibliografia	91
8. ANEXOS	128
Anexo I: Instrumento de investigação epidemiológica	129
Anexo II: Aprovação do Comitê de Ética do Hospital São José	135
Anexo III: Soluções e reagentes	136
Anexo IV: 1993 Sistema de classificação da infecção pelo HIV (CDC, 1992):	140
Anexo V: Artigo submetido para publicação	143
Anexo VI: Apresentações em congressos	166

# 1 INTRODUÇÃO

A doença tuberculose (TB) está presente na população humana desde a antiguidade. Foram encontrados, em múmias egípcias datadas de 3000 anos atrás, sinais definitivos de tuberculose (GTI, 2006). Da mesma forma, foram observados bacilos álcool-ácido resistentes em pulmões de múmias do Peru datadas de aproximadamente 700 A.D. e, posteriormente, outros casos de tuberculose foram observados em múmias da América do Sul (ALLISON; MENDOZA; PEZZIA, 1973). A tuberculose, nos tempos de Hipócrates, era conhecida como “*phthisis*”, um termo derivado da Grécia que significa “consumpção” (GTI, 1996; DANIEL; BATES; DOWNES, 1994). No século 19, a tuberculose tornou-se conhecida como “a praga branca” e foi responsável por muitas mortes na Europa e nos Estados Unidos da América. Em 24 de março de 1882, Robert Koch descreveu o bacilo da tuberculose, ainda hoje conhecido como ‘bacilo de Koch’ e também demonstrou ser este o agente causador da tuberculose (KOCH, 1932). A partir de seus estudos e da publicação, em 1884, dos “Postulados de Koch” marcou-se o início de importantes avanços na pesquisa da tuberculose como a descoberta da característica de álcool-ácido resistência destes organismos e a coloração de Ziehl-Neelsen, resultando no desenvolvimento de vários métodos de detecção da bactéria por microscopia, culturas *in vitro* e análise genômica, além do desenvolvimento de medidas terapêuticas e preventivas eficazes. Posteriormente outras espécies de micobactérias foram descobertas, sugerindo que o bacilo da tuberculose era um dos muitos microrganismos do gênero.

O gênero *Mycobacterium* contém muitas espécies de patógenos estritos e oportunistas que acometem igualmente humanos e animais. Apesar da maioria dos membros do gênero ser avirulenta para o homem, algumas espécies como os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o *M. leprae* são importantes patógenos humanos (PFYFFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JUNIOR, 2003; RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001).

## 1.1 O gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* é um dos mais antigos gêneros definidos. Seu nome genérico inicialmente designava um grupo de organismos que crescia como uma película de bolor em meios líquidos. Da ordem Actinomycetales, o gênero *Mycobacterium* é o único na família Micobacteriaceae (WAYNE, 1986).

O gênero pode ser classificado, de acordo com o seu potencial patogênico para humanos, em patogênicas estritas, patogênicas oportunistas e raramente patogênicas (RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001). Uma divisão natural existe em relação às características de crescimento sob condições ideais *in vitro*, separando-o em espécies de crescimento lento e de crescimento rápido. As espécies de crescimento lento usualmente têm tempo de geração de aproximadamente 24 horas e requerem mais de 7 dias para formarem colônias enquanto que as espécies de crescimento rápido têm tempo de geração de 3 a 4 horas e as colônias são evidenciadas em menos de 7 dias (PFYFFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JUNIOR, 2003). Por razões práticas, as micobactérias são diferenciadas entre dois grupos: o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e ‘*mycobacteria other than the M. tuberculosis complex*’ (MOTT ou NTM). O complexo *tuberculosis* é composto por 5 espécies que são agrupadas em razão de suas propriedades bioquímicas e homologia genômica (>95% DNA-DNA): *M. tuberculosis*, que é responsável pela tuberculose humana; *M. bovis*, que predominantemente causa tuberculose em bovinos, mas também causa doença em outros animais inclusive humanos; *M. africanum*, que causa tuberculose humana e é essencialmente limitado à África; *M. microti*, que é um patógeno raro de roedores e pequenos mamíferos e que recentemente foi identificado como causador de doença em humanos imunocomprometidos (VAN SOOLINGER *et al.*, 1998) e *M. canettii* (VAN EMBDEN *et al.*, 2000). Recentemente algumas subespécies têm sido propostas: *M. caprae* (ARANAZ *et al.*, 2003; ARANAZ *et al.*, 1999) e *M. pinnipedii* (COUSINS *et al.*, 2003).

## 1.2 Características e estrutura das micobactérias

As micobactérias são definidas como bactérias aeróbias, álcool-ácido resistentes, não formadoras de esporos, imóveis, levemente curvas ou retas, medindo 0,2 a 0,6µm por 1,0 a 10µm. A morfologia das colônias varia entre as espécies, apresentando-se de lisas a rugosas, de não-pigmentadas a pigmentadas (PFYFFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JUNIOR, 2003). As bactérias são classificadas no gênero *Mycobacterium* com base na sua característica de álcool-ácido resistência e na presença de ácidos micólicos de alto peso molecular em sua parede celular. O DNA das espécies de micobactérias contém alto teor de bases nitrogenadas citosina e guanina (C + G) com taxas entre 62 mol % a 70 mol % (RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001), exceção feita pelo *M. leprae* que contém 56% C + G (CLARK-CURTISS *et al.*, 1985).

Algumas propriedades específicas do gênero como a álcool-ácido resistência, seu tempo de crescimento, a resistência a detergentes e aos antimicrobianos além de sua capacidade de sobrevivência intracelular em macrófagos são determinadas pelo envelope bacteriano que tem superfície hidrofóbica (BARRY, 2001). Conforme mostrado na figura 1, o envelope é constituído de uma membrana plasmática, que é aparentemente semelhante à membrana plasmática de outras bactérias, circundada por uma complexa parede de carboidratos e lipídios que, por sua vez, é circundada por uma cápsula de polissacarídeos, como o lipoarabinomanan e lipooligossacarídeos derivados da manose, proteínas e, relativamente, pequena quantidade de lipídios (DAFFÉ; DRAPER, 1998). A cápsula é visualizada através de microscopia eletrônica como uma zona eletro-transparente principalmente nas espécies patogênicas, como *M. tuberculosis* e *M. avium*, e está ausente nas não-patogênicas, como o *M. smegmatis* (RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001). A parede celular é composta por um esqueleto de peptidoglicano covalentemente ligado com moléculas de ácido arabinogalactano-micolato associado a uma cobertura de variados lipídios livres e polipeptídeos (DAFFÉ; DRAPER, 1998; BRENNAN; DRAPER, 1994). Os ácidos micólicos são ácidos graxos  $\alpha$ -alquil  $\beta$ -hidroxi de cadeias longas e de alto peso molecular, produzidas por todas as micobactérias, constituindo 40-60% do peso do envelope bacteriano (DUBNAU *et al.*, 2000). Esses ácidos micólicos juntos com os lipídios livres conferem à parede celular uma barreira de permeabilidade hidrofóbica (BRENNAN; DRAPER, 1994). A membrana plasmática possui uma estrutura básica que não difere das outras membranas plasmáticas de outras bactérias: lipídios polares, principalmente fosfolipídios agrupados, em associação com proteínas, formando uma bi-camada lipídica (DAFFÉ; DRAPER, 1998).

Tem sido descrito que vários constituintes da parede celular, como os ácidos micólicos, lipoproteínas e arabinogalactatanos, são intensamente antigênicos e são primordiais para a patogenicidade do *M. tuberculosis* (RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001; DUBNAU *et al.*, 2000; DAFFÉ; DRAPER, 1998).

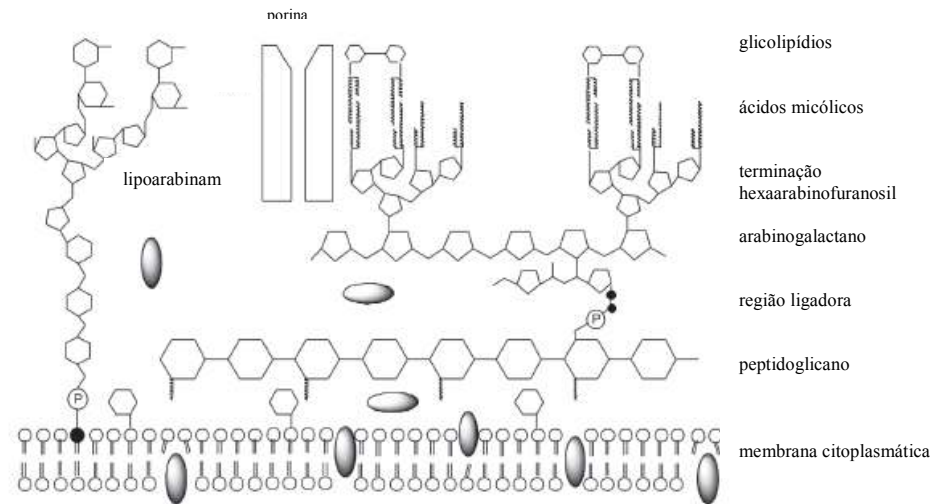


Figura 1- Estrutura da parede celular das micobactérias.

Fonte: (DUCATI *et al.*, 2006).

### 1.3 Patogênese e resposta imune às micobactérias

#### 1.3.1 Resposta imune inata

A rota de entrada no corpo do *M. tuberculosis* é, usualmente, via trato respiratório, através da inalação de bactérias aerossolizadas em pequenas gotículas de tamanho suficiente (1 a 2µm) para permitir a passagem aos bronquíolos e alvéolos. Entretanto, a maioria dos bacilos inalados fica depositada no epitélio do trato respiratório superior onde são expelidos através da atividade mucociliar (FITZGERALD; HAAS, 2005; HINGLEY-WILSON; SAMBANDAMURTHY; JACOBS, 2003; FROTA, 2002). Após a entrada no pulmão, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos alveolares e células dendríticas, e, ou são mortos, ou sobrevivem para iniciar infecção (KUAFMANN, 2005; FENTON; VERMEULEN, 1996). O contato inicial entre o bacilo e o macrófago é mediado por uma gama de receptores, como receptores de complemento (FERGUSON *et al.*, 2004), receptor de manose (KANG *et al.*, 2005), ICAM-3 (CAMBI; KOOPMAN; FIGDOR, 2005), DC-SIGN (GEIJTENBEEK *et al.*, 2003) e colesterol da membrana plasmática (CHASTELLIER; THILO, 2006). A infecção dos macrófagos induz um amplo espectro de defesas do hospedeiro, abrangendo a imunidade inata e adquirida. Alguns componentes da parede celular como o lipomanam, o lipoarabinomanam, a lipoproteína 19-kDa e o fosfatidilinositol, ativam macrófagos e células dendríticas através dos receptores *Toll-like* (TLR) TLR2 e TLR4 (TJÄRNLUND *et al.*, 2006; QUESNIAUX *et al.*, 2004; GILLERON;

QUESNIAUX; PUZO, 2003; THOMA-USZYNSKI *et al.*, 2001 e UNDERHILL *et al.*, 1999) induzindo a produção de peptídeos antimicrobianos e citocinas pró-inflamatórias através da ativação do fator nuclear (NF- $\kappa$ B) e MAP-kinase (SALGAME, 2005; REILING *et al.*, 2002; STENGER; MODLIN, 2002 e MEANS *et al.*, 1999). O exsudato contendo fatores quimiotáticos atrai monócitos, linfócitos e neutrófilos circulantes para o sítio da infecção. Essa migração de linfócitos e monócitos poderá levar a formação de um granuloma para a contenção do microorganismo.

O *M. tuberculosis* pode sobreviver nos macrófagos interrompendo a maturação do fagossomo, prevenindo sua destruição por intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio e sua degradação por enzimas lisossômicas (KAUFMANN, 2006). Alguns fatores estão relacionados à inibição da fusão fagossomo-lisossomo e conseqüente deficiência de acidificação do fagossomo: exclusão da bomba de prótons ATPase vacuolar (STURGILL-KOSZYCKI *et al.*, 1994), modulação da proteína ligadora de cálcio calmodulina (MALIK; IYER; KUSNER, 2001), retenção da proteína macrofágica TACO (*tryptofan aspartate-containing coat*) presente em fagossomos infectados (PIETERS, 2001; FERRARI *et al.*, 1999), exclusão e retenção de GTPases da família *Ras* (VIA *et al.*, 1997), além de algumas substâncias micobacterianas como glutamina sintetase e sulfatides (HARTH; HORWITZ, 1999; GOREN *et al.*, 1976).

A infecção usualmente não determinará o desenvolvimento de doença ativa porque a resposta imune montada contra a infecção geralmente é efetiva em conter o patógeno, apesar de não eliminá-lo. A tuberculose primária resulta de um pequeno percentual das infecções, provavelmente devido a uma deficiência na iniciação de uma resposta imune apropriada. Na maioria dos casos de infecção pelo *M. tuberculosis*, o indivíduo é assintomático e não bacilífero, podendo permanecer neste estágio de latência clínica por toda sua vida. Entretanto, a reativação de uma infecção latente pode ocorrer devido a estados de imunodeficiência (FLYNN; CHAN, 2001).

### 1.3.2 Reposta imune adquirida

Como o *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular, a imunidade protetora requer uma resposta imune mediada por células ao invés de uma resposta imune humoral. Os macrófagos infectados e as células dendríticas podem agir como células apresentadoras de antígeno, sinalizando a presença de micobactérias intracelulares através da expressão de moléculas derivadas desses patógenos na superfície celular utilizando as moléculas do complexo de histocompatibilidade maior classe II (MHC-II) (FLYNN, 2004; HINGLEY-WILSON;

SAMBANDAMURTHY; JACOBS, 2003). Estes sinais são reconhecidos pelas células T CD4+. As citocinas produzidas por macrófagos e células dendríticas, como IL-12 e IL-18, induzem o desenvolvimento de células Th1 a partir precursores virgens de células T CD4+ e também estimulam a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (O’GARRA; ARAI, 2000; BARNES; MODLIN; ELLNER, 1994). Além disso, existem evidências que as células T CD8+ possam contribuir para uma resposta imune adequada (KAUFMANN, 2005; TAN *et al.*, 1997), após o reconhecimento de peptídeos micobacterianos citoplasmáticos apresentados via MHC classe I (BOOM *et al.*, 2003).

As células T, uma vez ativadas, produzem IFN- $\gamma$  e IL-2 que ativam macrófagos (KAUFMANN, 2006; FLYNN, 2004). Ademais, as células T também expressam atividades microbidas diretas através da ação de perforinas e granulosinas (KAUFMANN, 2005, FLYNN; CHAN, 2001).

Várias citocinas são secretadas por macrófagos e células dendríticas em resposta ao *M. tuberculosis*. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) apresenta múltiplas funções na resposta imune contra o *M. tuberculosis*: atua como mediador da ativação de macrófagos, induz em sinergismo com o IFN- $\gamma$  a expressão da óxido nítrico sintetase (NOS) além de ser importante na formação e manutenção do granuloma (SCHLUGER, 2005; FLYNN, 2004; CHAN *et al.*, 1992; LIEW; LI; MILLOTT, 1990). A IL-12 é induzida após a fagocitose do *M. tuberculosis* por macrófagos e células dendríticas e direciona o desenvolvimento de uma resposta TH1 com produção de IFN- $\gamma$  (FLYNN, 2004; LADEL *et al.*, 1997). O IFN- $\gamma$  é uma citocina primordial no controle do bacilo da tuberculose por seu papel na ativação e recrutamento de macrófagos para a morte de bactérias intracelulares e a formação do granuloma, respectivamente (FLYNN, 2004; FLYNN; CHAN, 2001). Em contraste, a IL-10 é considerada como anti-inflamatória, pois possui propriedades antagônicas à ativação macrofágica incluindo inibição da produção de IL-12 com conseqüente redução da produção de IFN- $\gamma$  (FLYNN; CHAN, 2001).

#### **1.4 Epidemiologia da tuberculose**

A notificação de casos de tuberculose em países industrializados declinou durante quase todo o século XX devido a melhores condições sócio-econômicas da população e, possivelmente, devido ao isolamento dos pacientes em sanatórios. Esse declínio foi acelerado na segunda metade do mesmo século pelo uso de quimioterapia efetiva (MAHER; RAVIGLIONE, 2005). A partir da metade dos anos 80, entretanto, alguns países começaram a notar uma redução

no declínio das taxas de notificação e outros evidenciaram um aumento dessas taxas (MAHER; RAVIGLIONE, 2005; DANIEL; BATES; DOWNES, 1994 e RAVIGLIONE *et al.*, 1993). Vários fatores foram citados como causa para o recrudescimento da tuberculose. Dentre eles, os mais importantes foram a desestruturação da infra-estrutura de saúde pública necessária para o controle da tuberculose, a imigração de pessoas provenientes de países de alta prevalência e o impacto da epidemia de HIV (MAHER; RAVIGLIONE, 2005; RIEDER *et al.*, 1994; BRUDNEY; DOBKIN, 1991).

Por conseqüência, em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose uma doença de emergência global devido à escalada da epidemia e à urgente necessidade de melhoria global no controle da tuberculose (WHO, 1994; WHO, 1993).

Atualmente, devido às limitações da notificação de tuberculose e à dificuldade em mensurar o número de casos e mortes, a extensão da doença tuberculosa tem de ser estimada. Em 2004, a OMS estimou, mundialmente, em 8,9 milhões o número de casos novos de TB, com uma taxa de incidência de 140 por 100.000 habitantes. Deste total, 3,9 milhões tinham baciloscopia positiva (62/100.000 habitantes). Estima-se ainda que 1,7 milhões (27/100.000 habitantes) de pessoas morreram de TB em 2004. Globalmente, em cinco das seis regiões da OMS, o número de casos novos de TB ficaram estáveis ou em queda, exceto na região da África onde a incidência de TB continua crescendo seguindo a epidemia de HIV. Além disso, mais de 80% dos casos novos vivem na África Sub-Sahariana e Ásia (WHO, 2006). A figura 2 mostra a estimativa de taxas de incidência por países em 2004.

No Brasil, no ano de 2004 foram notificados 79.365 casos de tuberculose, com incidência de 23,5 casos por 100.000 habitantes. Entre os anos de 2004 e 2005, houve redução na taxa de incidência e de casos encerrados por abandono no país (DATASUS, 2006).

No estado do Ceará, observou-se um aumento nas taxas de incidência entre os anos de 2004 e 2005, passando de 49,4 para 50,1 casos por 100.000 habitantes. Isso representou, em 2005, um total de 4.059 casos de tuberculose notificados no estado, dos quais 61% eram bacilíferos. Neste mesmo ano, 95% dos municípios do estado apresentaram notificação de casos e somente 5% permaneceram silenciosos, sendo este silêncio decorrente de sub-notificações (SESA, 2006).

Estimativa de taxa de incidência de TB, 2004.

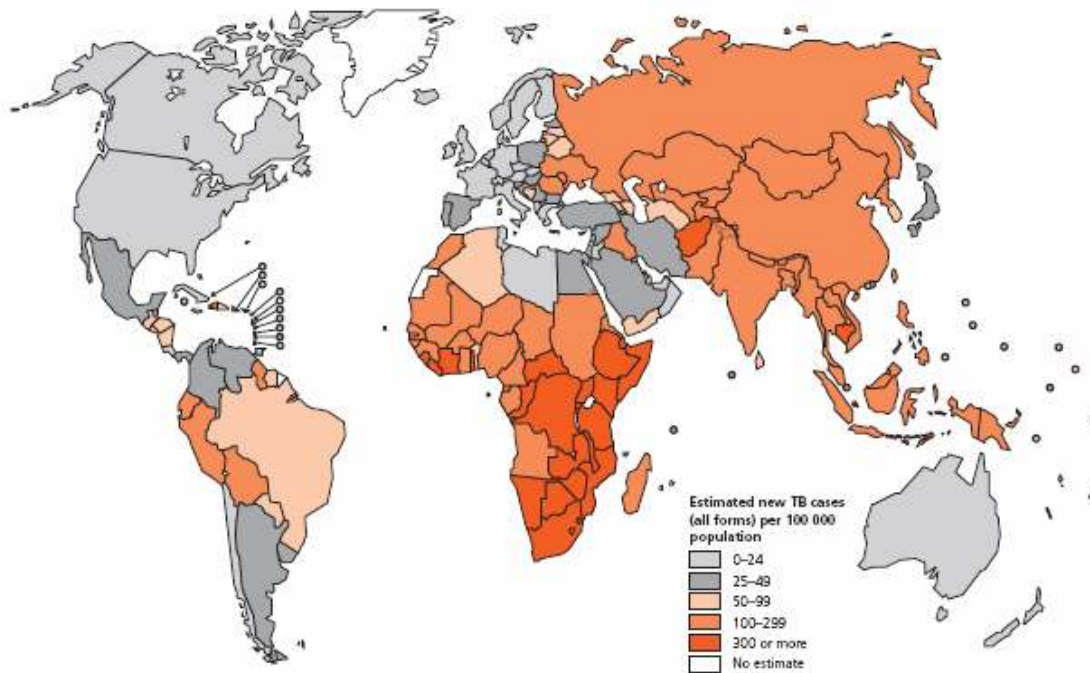


Figura 2: Estimativa de taxas incidência de TB por países em 2004. Fonte: WHO, 2006.

De forma geral, os países em desenvolvimento sofrem mais o impacto da TB. Estima-se que 95% dos casos novos e 98% das mortes por TB ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (RAVIGLIONE; SNIDER; KOCHI, 1995). Além disso, a TB tem sido responsável por mais de 25% das mortes preveníveis nestes países (MURRAY; STYBLO; ROUILLON, 1990).

Portanto, as notificações e estimativas mundiais sugerem um regular declínio nos casos de tuberculose em muitas regiões exceto na África Sub-Sahariana e Ásia. As razões para a persistência dessa elevada incidência incluem: 1) a pobreza e a cada vez maior divisão irregular de renda entre ricos e pobres; 2) o abandono prévio dos programas de controle de tuberculose; 3) mudanças demográficas; e 4) o impacto da pandemia do HIV (MAHER; RAVIGLIONE, 2005; RAVIGLIONE; LEULMO, 1996).

### 1.5 Estrutura genômica do *Mycobacterium tuberculosis*

Em 1998, Cole *et al.* publicaram a seqüência completa do genoma da cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv. O genoma deste patógeno consiste em uma seqüência de 4.411.532 pares

de base, com alto conteúdo de C + G representando 65,6% do genoma. O genoma é rico em seqüências de inserções repetitivas. As principais repetições identificadas são a seqüência de inserção IS6110 e a seqüência polimórfica rica em G + C (PGRS). Ademais, um único operon RNA ribossômico, o *rrnA*, produz as moléculas funcionais de RNA e, distintamente das outras bactérias de crescimento rápido que têm um ou mais operons próximos à origem de replicação (*oriC*) (PARKHILL *et al.* 2001), está localizado a 1.500 kilobases (kb) do *oriC*. O *M. tuberculosis* H37Rv contém 56 cópias de seqüências de inserção (IS) pertencentes a diferentes famílias. A mais freqüente é a IS6110 com 16 cópias no genoma (COLE *et al.*, 1998; COLE, 1999).

Foram identificadas 3.924 regiões abertas de leitura (*open reading frames*, ORF) no genoma que correspondem a 91% do potencial da capacidade de codificação. Entretanto, somente 40% das proteínas têm suas funções conhecidas (COLE *et al.*, 1998).

## **1.6 Métodos de identificação de micobactérias**

### **1.6.1 Identificação fenotípica**

As espécies de micobactérias são tradicionalmente diferenciadas com base na velocidade de crescimento, temperatura de crescimento ideal, morfologia das colônias, produção de pigmentos e crescimento na presença de niacina e sorotipagem. Outras características de crescimento são úteis para a determinação da espécie, como a habilidade de algumas espécies de crescer em meios outros que não o Löwenstein-Jensen (LJ), ou a habilidade de crescer na presença de inibidores como o ácido p-nitrobenzoato (PNB) e hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH). Ademais, propriedades bioquímicas específicas são úteis para a discriminação entre as espécies, como, por exemplo, a presença ou a ausência de algumas enzimas como a urease, arilsulfatase e catalase e/ou as características específicas de cada enzima, como a termo-resistência da catalase (VINCENT *et al.*, 2003; RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001). Os testes para identificação de micobactérias estão descritas nos anexos.

### **1.6.2 Análise de ácidos micólicos**

Os ácidos micólicos são ácidos graxos  $\beta$ - hidroxí com uma longa cadeia na posição  $\alpha$  e são os principais componentes do notável conteúdo lipídico da parede celular micobacteriana. Eles diferem no número de átomos de carbonos, variando de 60 a 90 átomos, e na presença de diferentes grupos funcionais. Os padrões de ácidos micólicos da parede celular geralmente variam entre as espécies. Assim, a análise dos ácidos micólicos é útil na identificação das micobactérias.

Três métodos diretos são usados para a análise dos ácidos micólicos: cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e cromatografia gás-líquido (GLC) (TORTOLI, 2003).

### 1.6.3 Identificação genotípica

#### 1.6.3.1. PCR e análise com endonucleases de restrição

Um método extensivamente usado para a identificação de micobactérias é o PRA (*PCR-restriction endonuclease analysis*). Ele baseia-se em na amplificação do gene que codifica uma proteína de choque térmico de 65-kDa, o *hsp65*, seguido por digestão enzimática com duas endonucleases de restrição (*BstEII* e *HaeIII*) (TELENTI *et al.*, 1993b). Os produtos da digestão enzimática, separados por eletroforese em gel de agarose, aparecem como bandas cujos padrões são usualmente espécies específicos. O *hsp65* é altamente conservado entre as espécies de micobactérias, no entanto apresenta regiões hipervariáveis cujas seqüências podem ser usadas para fins de identificação (RINGUET *et al.*, 1999). O *M. tuberculosis* é facilmente diferenciado das NTM pelas características de suas bandas na digestão enzimática com a *HaeIII*. Entretanto, os membros do MTBC não são discriminados pelo PRA enquanto que a maioria das NTM é reconhecida por este método (VINCENT *et al.*, 2003).

Outros alvos genômicos têm sido usados para o PRA. Eles incluem o gene *rpoB* que é responsável pela resistência à rifampicina, o gene *dnaJ* e o ITS (*Internal Transcribed Spacer*) 16S-23S rRNA (PARK *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 1999; TAKEWAKI *et al.*, 1994).

As vantagens do PRA são: a identificação é independente da taxa de crescimento, os equipamentos e reagentes são de baixo custo, a metodologia é relativamente rápida e identifica a maioria das espécies de micobactérias incluindo aquelas não identificadas por métodos fenotípicos e HPLC (VINCENT *et al.*, 2003).

#### 1.6.3.2. Sondas de DNA

Algumas sondas de DNA estão comercialmente disponíveis, todas apresentando vantagens e restrições referentes à metodologia empregada. A AccuProbe® (GenProbe Inc., San Diego, Calif) é um conjunto com uma sonda de DNA baseado na detecção de rRNA específico de MTBC, MAC, *M. kansasii* e *M. goodii*. O INNO-LiPA Mycobacteria (Innogenetics NV, Gent,

Bélgica) baseia-se na técnica de hibridização reversa na qual a sonda é representada por um amplicon 400-550 pb do ITS 16S-23S rRNA, o conjunto inclui sondas específicas para várias espécies de micobactérias (LEÃO *et al.*, 2004).

### 1.6.3.3. Seqüenciamento de DNA

A disponibilidade de tecnologias de seqüenciamento de DNA constitui um grande benefício para a identificação de micobactérias. A identificação de “assinaturas” espécie-específicas dentro das regiões variáveis de genes altamente conservados permitiu o desenho de protocolos simples baseados em ampliações seguidos de seqüenciamento do produto em estudo. O polimorfismo de vários genes conservados tem sido investigado para a identificação de micobactérias: o gene *dnaJ* (TAKEWAKI *et al.*, 1994), o gene *sod* que codifica a superóxido dismutase (ZOLG; PHILIPPI-SCHULZ, 1994), o gene *gyrB* codificante da girase subunidade B (KASAI; EZAKI; HARAYAMA, 2000), o *rpoB* codificante da RNA polimerase (KIM *et al.*, 1999) e a seqüência ITS 16S-23S (PARK *et al.*, 2000). No entanto, os alvos mais amplamente usados são o gene *hsp65* e o 16S rDNA (RINGUET *et al.*, 1999; ROGALL; FLOHR; BOTTFGER, 1990).

## 1.7 Tratamento da tuberculose

Até meados do século 20, não existia tratamento definitivo disponível para TB. Antes do desenvolvimento de drogas efetivas, 50% dos pacientes com TB pulmonar ativa morriam em 2 anos e somente 25% curavam-se (STYBLO, 1980). Em meados dos anos 40, com a disponibilidade da estreptomicina, da isoniazida e do ácido para-aminosalicílico (PAS), o tratamento curativo tornou-se uma realidade (SHARMA; MOHAN, 2004).

Atualmente, 100% dos casos novos de tuberculose são praticamente curáveis, desde que obedecidos os princípios da moderna quimioterapia. De acordo com o Ministério da Saúde (2002) o emprego de uma associação medicamentosa adequada, com doses corretas, por tempo suficiente e com supervisão da tomada dos medicamentos associados ao diagnóstico precoce da doença são os meios para evitar a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência às drogas, assegurando, assim, a cura do paciente.

Os antimicrobianos para tuberculose têm sido tradicionalmente classificados como: drogas de primeira linha, que têm eficácia superior com toxicidade tolerável; e drogas de segunda linha, que têm menor eficácia ou maior toxicidade, ou ambos. São consideradas drogas de primeira linha: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) e estreptomicina (S). As drogas de segunda linha são: quinolonas, linezolida, etionamida (Et), cicloserina, amicacina, capreomicina, kanamicina, ácido para-aminosalicílico, terizidona e tioacetazona (WALLACE; GRIFFITH, 2005; HENN; JOHN, 2002).

Os agentes antituberculose de primeira linha, com exceção do etambutol, são bactericidas. As atividades bactericidas antituberculose intra-cavitária, intracelular e no foco necrótico fornecem as bases para a eficácia dos regimes de curta duração. A combinação de três agentes bactericidas ativos contra organismos intracelulares (isoniazida, rifampicina e pirazinamida) é fundamental para o regime atualmente recomendado de 6 meses de tratamento (WALLACE; GRIFFITH, 2005).

As drogas com atividade antimicobacterianas apresentam diferentes mecanismos de ação, tais como: inibição da síntese de ácidos micólicos (isoniazida e etionamida), inibição da transcrição ribossômica (rifampicina), acidificação do citoplasma (pirazinamida), inibição da síntese protéica (estreptomicina e amicacina) e inibição da DNA girase (fluoroquinolonas).

O Ministério da Saúde do Brasil (2002), através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose, estabelece os regimes terapêuticos a serem utilizados no país. A escolha do regime de tratamento (Quadro 1) é baseado na forma clínica e na classificação de cada caso em caso novo, recidiva após cura, recidiva após abandono e falência dos esquemas anteriores. As definições de caso novo, recidiva após cura, recidiva após abandono e falência de esquema estão descritos na seção Materiais e Métodos, sub-ítem “Outras definições”.

## **1.8 Tuberculose multirresistente**

A tuberculose multirresistente às drogas (MDR-TB) é um dos mais preocupantes elementos da pandemia de resistência antimicrobiana porque os pacientes que falham ao tratamento têm maior risco de morte (DYE *et al.*, 2002 e SHARMA *et al.*, 1996). No Brasil, são classificados como casos de MDR-TB os pacientes que apresentam bacilos com resistência mais de duas drogas, incluindo entre elas a isoniazida e a rifampicina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A resistência às drogas antituberculose pode ser classificada em primária e secundária. A resistência primária é aquela que está presente antes do início do tratamento. Ela inclui a resistência em cepas selvagens que nunca tiveram contato com as drogas e a resistência que ocorre como resultado da exposição de uma cepa às drogas, mas em outro paciente. Resistência secundária ou adquirida indica a emergência de resistência em uma situação de prescrição inadequada ou má aderência ao tratamento. Ela indica o desenvolvimento de resistência em cepas previamente sensíveis às drogas durante tratamento antimicrobiano (FITZGERALD; HAAS, 2005 e SHARMA; MOHAN, 2004).

Quadro 1: Esquemas de tratamento de tuberculose indicados no Brasil.

Situação	Esquema Indicado
Caso novo sem tratamento anterior ou caso novo com tratamento e cura há mais de 5 anos.	Esquema I (Básico)
Com tratamento anterior: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Recidiva após cura com Esquema I</li> <li>• Retorno após abandono do Esquema I</li> </ul>	Esquema I-R (Reforçado)
Tuberculose meningoencefálica	Esquema II
Falência dos esquemas I ou I-R	Esquema III

\* Esquema I: RHZ por 2 meses + RH por 4 meses; esquema I-R = RHZE por 2 meses + RHE por 4 meses; ESQUEMA II: RHZ por 2 meses + RH por 7 meses; esquema III: SZE<sub>Et</sub> por 3 meses + E<sub>Et</sub> por 9 meses. Abreviações: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E), estreptomina (S) e etionamida (Et). Fonte: Ministério da Saúde do Brasil, 2002.

Geralmente a resistência a drogas em espécies bacterianas é mediada por plasmídios ou transposons, todavia estes elementos móveis não estão relacionados com a resistência a drogas em *M. tuberculosis* (MARTIN *et al.*, 1990). Ao invés destes elementos, a resistência em *M. tuberculosis* é causada por mutações pontuais cromossômicas. Uma característica importante dessas mutações é que elas não são vinculadas, o que faz com que a resistência a uma droga usualmente não seja associada com resistência à outra droga (SHARMA; MOHAN, 2004). Assim, o fenótipo de resistência a várias drogas é causado pela acumulação de mutações em diferentes genes envolvidos em resistência.

Em relação aos genes envolvidos na resistência, pode ocorrer mutação de genes alvos ou de genes relacionados com a conversão do precursor da droga (RAMASWAMY; MUSSER, 1998). Vários autores relatam os diferentes mecanismos de resistência de drogas antimicobacterianas, incluindo mutações em *katG* (ZHANG; GARBE; YOUNG, 1993), *inhA* (BASSO *et al.*, 1998), *kasA* (LEE *et al.*, 1999), *rpoB* (TELENTI *et al.*, 1993a), *pncA* (MILLER *et al.*, 1995) e *rpsL* (FINKEN *et al.*, 1993). O quadro 2 lista os mecanismos moleculares de resistência às drogas (SHARMA; MOHAN, 2004).

Vários fatores têm sido implicados no desenvolvimento da MDR-TB como a pobreza, cavitações pulmonares, tratamento inadequado e incompleto, adesão inadequada ao tratamento e os fatores genéticos do hospedeiro. Entretanto, o fator mais fortemente associado com a presença de MDR-TB é uma história prévia de tratamento de tuberculose (SHARMA; MOHAN, 2004; BARROSO *et al.*, 2003; ALRAJHI *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2003; ESPINAL *et al.*, 2001; TELZAK *et al.*, 1999).

Quadro 2: Drogas antituberculose e os genes envolvidos em suas resistências. Fonte: SHARMA; MOHAN, 2004.

<b>Droga</b>	<b>Gene(s) envolvido(s) na resistência a droga</b>
Isoniazida	Enoil acp redutase ( <i>inhA</i> ) Catalase-peroxidase ( <i>kat G</i> ) Alquil hidropéroxido redutase ( <i>ahpC</i> ) Regulador de estresse oxidativo ( <i>oxyR</i> )
Rifampicina	RNA polimerase subunidade B ( <i>rpoB</i> )
Pirazinamida	Pirazinamidase ( <i>pncA</i> )
Estreptomicina	Proteína ribossomal subunidade 12 ( <i>rpsL</i> ) RNA ribossomal 16s ( <i>rrs</i> ) Gene aminoglicosídeo fosfotransferase ( <i>strA</i> )
Etambutol	Arabinosil transferase ( <i>emb A, B e C</i> )
Fluoroquinolonas	DNA girase ( <i>gyr A e B</i> )

### 1.9 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) tipo 1 e 2 são agentes etiológicos da Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA, ou, em inglês *AIDS* ou ainda *aids*). O HIV-1 e o

HIV-2 são classificados como membros do gênero *Lentivirus*, pertencente à família *Retroviridae*. A infecção pelo HIV resulta em uma doença crônica e progressiva, com deterioração gradual do sistema imunológico do ser humano. A aids é o estágio final do processo patológico no qual há uma destruição progressiva do sistema imune da pessoa infectada, resultando na incapacidade de controlar doenças infecciosas e doenças malignas proliferativas (SCHÜPBACH, 2003). A aids foi reconhecida pela primeira vez nos Estados Unidos em 1981 através de relatos de infecções oportunistas inexplicáveis como pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente conhecido como *Pneumocystis carinii*) e Sarcoma de Kaposi entre homens que praticavam sexo com homens em Nova York e São Francisco (MASUR *et al.*, 1981; GOTTLIEB *et al.*, 1981; DURACK, 1981). Em 1983, simultaneamente, Robert Gallo, nos Estados Unidos, e Luc Montaigner, na França, isolaram um novo vírus linfotrópico (GALLO *et al.*, 1983 e BARRÉ-SINOUSSE *et al.*, 1983). Posteriormente, este vírus foi confirmado como sendo virologicamente e sorologicamente associado à aids (GALLO *et al.*, 1984; LEVY *et al.*, 1984; POPOVIC *et al.*, 1984; SARNGADHARAN *et al.*, 1984 e SCHÜPBACH *et al.*, 1984).

### 1.9.1 Epidemiologia do HIV

Ao final de 2005, estimava-se que mundialmente 38,6 milhões de pessoas estivessem vivendo com HIV mundialmente. Destes, 24,5 milhões eram da África Sub-Sahariana e 8,3 milhões na Ásia. Neste mesmo ano, estima-se em 4,1 milhões o número de adultos e crianças que se infectaram pelo HIV e 2,8 milhões de óbitos sendo aproximadamente 2 milhões destas mortes na África Sub-Sahariana. A África é a região com a mais alta taxa de prevalência na população adulta em geral (15-49 anos) chegando a 6,1% (UNAIDS, 2006). A figura 3 mostra as taxas de prevalência de infecção pelo HIV no mundo.

Especificamente, a África Sub-Sahariana permanece como a região do mundo mais afetada pela epidemia do HIV. Nesta região reside pouco mais de um décimo da população mundial, no entanto nela residem quase 64% dos casos de infecção pelo HIV do mundo.

No Brasil, até junho de 2006, haviam sido notificados 433.067 casos de aids, sendo a maioria concentrada na região Sudeste (62,3%) e 11% na região Nordeste. O sexo masculino foi responsável por 67,2% das notificações. A razão de sexos vem diminuindo sistematicamente, passando de 15,1 homens por mulher em 1986, para 1,5 homens por mulher em 2005. A taxa de incidência teve crescimento acelerado até 1998, com posterior redução da velocidade de crescimento, alcançando a taxa máxima de 20,7 por 100.000 habitantes em 2003. Desde então tem

ocorrido uma estabilização com discreta queda (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No estado do Ceará haviam sido notificados, até junho de 2006, um total de 8.019 casos de aids (DATASUS, 2006).

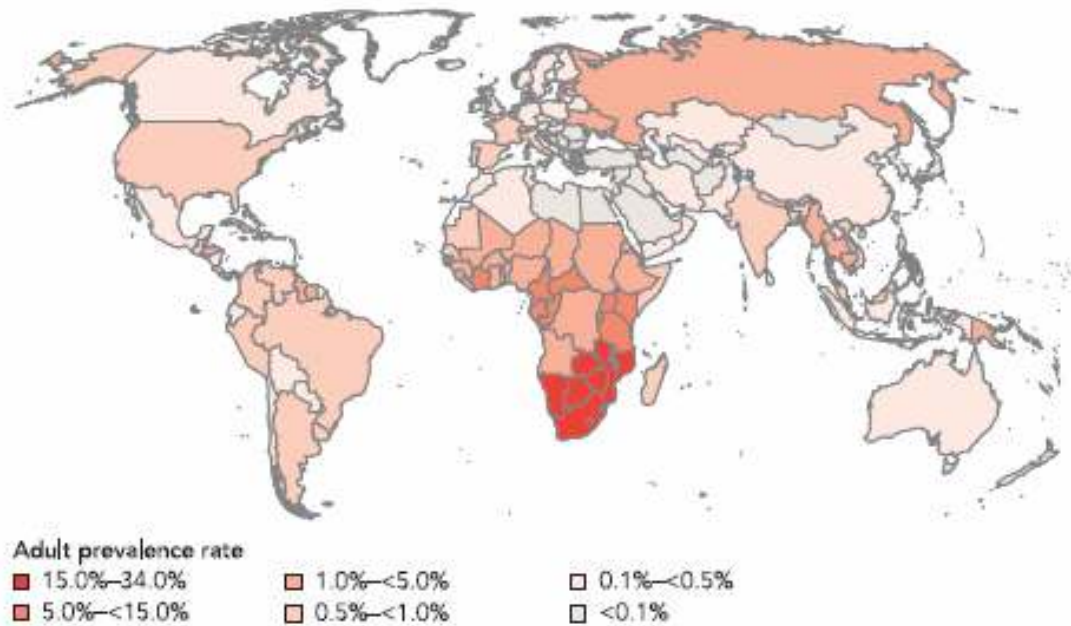


Figura 3: Taxas de prevalência de infecção pelo HIV no mundo. Fonte: UNAIDS, 2006.

De uma forma geral, acredita-se que as taxas de incidência de HIV tenham alcançado um limite no final dos anos 90 e estabilizaram-se subsequentemente, apesar do aumento de incidência em vários países. Provavelmente as mudanças comportamentais e os programas de prevenção são as responsáveis por essas mudanças favoráveis. Tal fato, aliado às taxas de mortalidade da aids, tem feito com que a prevalência mundial alcance níveis baixos. Entretanto, nos últimos anos o número de pessoas vivendo com HIV continua aumentando, pois há o prolongamento do tempo de vida com o uso de terapia antiretroviral (UNAIDS, 2006).

### 1.9.2 Manifestações clínicas da infecção pelo HIV

O espectro clínico da infecção pelo HIV varia de um estágio assintomático a uma imunodeficiência severa e associada a graves infecções oportunistas e neoplasias (GREENBERG *et al.*, 1992; FARIZO *et al.*, 1992).

Na infecção aguda ou primária, os sintomas aparecem durante o pico de viremia e da resposta imunológica e variam desde um quadro de gripe até sintomas semelhantes à infecção pelo

vírus da mononucleose infecciosa. Outras características associadas com a soroconversão incluem febre, linfadenopatia, sudorese, mialgia, artralgia, exantema cutâneo, calafrios, letargia, faringite, hepatoesplenomegalia, cefaléia, perda de peso, náuseas, vômitos e úlceras mucocutâneas (DAAR *et al.*, 2001; SCHACKER *et al.*, 1996). Tais sinais e sintomas ocorrem em 40 a 90% daqueles com infecção primária e usualmente manifestam-se dias a semanas depois da exposição (KAHN; WALKER, 1998 e PEDERSEN *et al.*, 1989), sendo relatado, em uma revisão, em média um tempo de 2 a 4 semanas pós-exposição (TINDALL; COOPER, 1991). O diagnóstico nesta fase da infecção não pode ser realizado com testes sorológicos padrões, pois estes detectam anticorpos e somente se tornarão positivos entre 3 semanas a seis meses (BUSCH; SATTEN, 1997). Desta forma, o diagnóstico laboratorial deve ser realizado através de detecção HIV-RNA plasmático e de antígeno p24 viral (DAAR *et al.*, 2001).

Depois da infecção primária ocorre uma fase assintomática, onde normalmente não existem sintomas clínicos, entretanto, a replicação viral é contínua e ocorre debilitação progressiva do sistema imunológico. Segue-se uma fase sintomática inicial onde aparecem sintomas inespecíficos como perda de peso, fadiga, diarreia, adinamia, sudorese noturna e mal-estar, além de processos oportunistas de menor gravidade, principalmente com acometimento mucocutâneo, como candidíase oral, herpes-zoster, leucoplasia pilosa oral e dermatite seborréica (WIGG, 2002).

Por fim, a imunossupressão atinge um estágio avançado, com contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/ $\mu$ L, com aparecimento das mesmas afecções anteriormente citadas em formas mais graves, além do aparecimento de infecções e processos patológicos definidores de aids.

O risco de progressão para doença aumenta com a duração da infecção (CDC, 1992; RUTHERFORD *et al.*, 1990). As taxas de progressão variam dependendo de fatores como: rota de infecção, tamanho do inóculo viral, patogenicidade da cepa viral infectante e estado imunológico do hospedeiro (DEL RIO; CURRAN, 2005). Devido a essa variação considerável entre pessoas, alguns marcadores laboratoriais foram descritos como preditores de progressão de doença, sendo a contagem de linfócitos T CD4+ e quantificação da carga viral (HIV-RNA) plasmática os melhores fatores preditores de progressão de doenças e de prognóstico (MELLORS *et al.*, 1997; MELLORS *et al.*, 1996; SAAG *et al.*, 1996 e STEIN; KORVICK; VERMUND, 1992).

## 1.10 Co-infecção tuberculose e HIV

### 1.10.1 Ligação biológica

A infecção pelo *M. tuberculosis* segue-se após a fagocitose e multiplicação dos bacilos inalados nos macrófagos alveolares não-especificamente ativados quando os bacilos são suficientemente virulentos para resistir às enzimas líticas dos fagolisossomos macrofágicos. Após algumas semanas o processo imune mediado por células leva a formação de um granuloma que mantém os bacilos controlados em seu interior enquanto houver um equilíbrio entre a resposta imune e os bacilos. As células T CD4<sup>+</sup> são essenciais na manutenção desse equilíbrio através do seu papel de produtor de citocinas para a ativação dos macrófagos. Nos pacientes infectados com o HIV, entretanto, a contagem de células T CD4<sup>+</sup> declina constantemente à medida que a infecção progride. Por essa razão, é perdida a habilidade de restringir os bacilos da tuberculose nos granulomas.

Por conseqüência, os pacientes infectados pelo HIV têm maior risco de desenvolver tuberculose ativa tanto por reativação de uma infecção latente ou a partir de uma progressão rápida de uma infecção recente (CARVALHO *et al.*, 2001; HAVLIR; BARNES, 1998). O risco de desenvolvimento de tuberculose nos pacientes co-infectados pelo HIV por reativação de uma infecção latente aumenta 5 a 15 % anualmente, aumentando à medida que piora a imunossupressão (ANTONUCCI *et al.*, 1995; SELWYN *et al.*, 1989). Além disso, estudos de epidemiologia molecular em pacientes HIV<sup>+</sup> realizados em São Francisco e Nova York sugerem que um terço dos casos em São Francisco e 40% em Nova York são devidos mais à transmissão recente do *M. tuberculosis* do que por reativação de infecção latente (SMALL *et al.*, 1994; ALLAND *et al.*, 1994).

O risco de desenvolver tuberculose durante toda a vida é de 5 a 10% em pacientes sem infecção pelo HIV contra 50% em pacientes infectados pelo HIV (WHO, 2004). Um estudo em mineradores de ouro na África do Sul mostrou que o risco de TB dobra no primeiro ano de infecção pelo HIV e continua aumentando levemente durante os anos seguintes (SONNENBERG *et al.*, 2005). Desta forma, a imunossupressão causada pelo HIV é o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença tuberculosa (ASTEN *et al.*, 2003).

### 1.10.2 Epidemiologia da co-infecção tuberculose e aids

A infecção pelo vírus HIV e a TB estão entre as principais causas de morte por agentes infecciosos no mundo (WEISS; McMICHAEL, 2004), aproximadamente 13 milhões de pessoas estão infectadas com ambos agentes causadores (WHO 2003). A pandemia do HIV aumentou globalmente a prevalência da tuberculose, principalmente em países pobres e subdesenvolvidos (WHO 2000). O maior impacto tem sido na África sub-Sahariana, onde as notificações de casos de TB têm, em média, triplicado desde meados dos anos 80 e as taxas de mortalidade durante o tratamento chegaram a 20% comparados com os 5% observados em países com bons programas de controle de tuberculose sem HIV (NUNN *et al.*, 2006). Além disto, nestes mesmos países tem havido um aumento anual constante de 10% para os casos de TB principalmente entre indivíduos de 15 a 49 anos de idade (SONNENBERG *et al.*, 2005).

A Organização Mundial da Saúde estimou em 8,9 milhões os novos casos de tuberculose em 2004 com 1,7 milhões de óbitos causados pela doença, incluindo aqueles co-infectados com HIV (WHO 2006). Do total de casos de TB estimados para 2004, 8,3% eram co-infectados com HIV (WHO 2006)

No estado do Ceará, no ano de 2005, foram notificados 111 casos de co-infecção TB-HIV, representado 2,4% das notificações de TB no estado para o mesmo ano. Além disso, nos anos de 2004 e 2005, foi observado um aumento numérico e percentual dos casos da co-infecção TB-HIV em relação aos quatro anos anteriores (SESA 2006).

A incidência e os casos de notificação de TB refletem o aumento na prevalência do HIV. Em países africanos onde a prevalência do HIV em adultos é menor que 4%, as taxas de notificação de TB têm também permanecidas estáveis ou com aumento discreto. Nos países que apresentam prevalência do HIV acima de 4%, as taxas de notificação de TB têm triplicado, com aumentos maiores em determinados países do que em outros (NUNN *et al.*, 2006). A figura 4 mostra a proporção de pessoas co-infectadas com TB-HIV no mundo. Comparando-se as figuras 2, 3 e 4, fica nitidamente evidenciado a forte associação entre a incidência de TB e a infecção pelo HIV.

O risco de desenvolvimento de tuberculose, no entanto, é reduzido em 70 a 90% para pacientes infectados pelo HIV que têm recebido terapia antiretroviral altamente potente (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*, HAART). Esses dados foram obtidos através de estudos

observacionais conduzidos em países com alta e baixa incidência de tuberculose (GIRARDI *et al.*, 2004). Os antiretrovirais (ARV) têm transformado uma condição fatal em uma doença crônica manejável, com taxas de mortalidade anual de pacientes mantendo-se bem abaixo dos 5% em pacientes tratados (CASCADE, 2000). Todavia, para que o tratamento com ARV possa prevenir uma fração significativa dos casos de TB, é necessário o tratamento precoce no curso da infecção pelo HIV associado à alta cobertura e adesão ao tratamento (WILLIAMS; DYE, 2003).

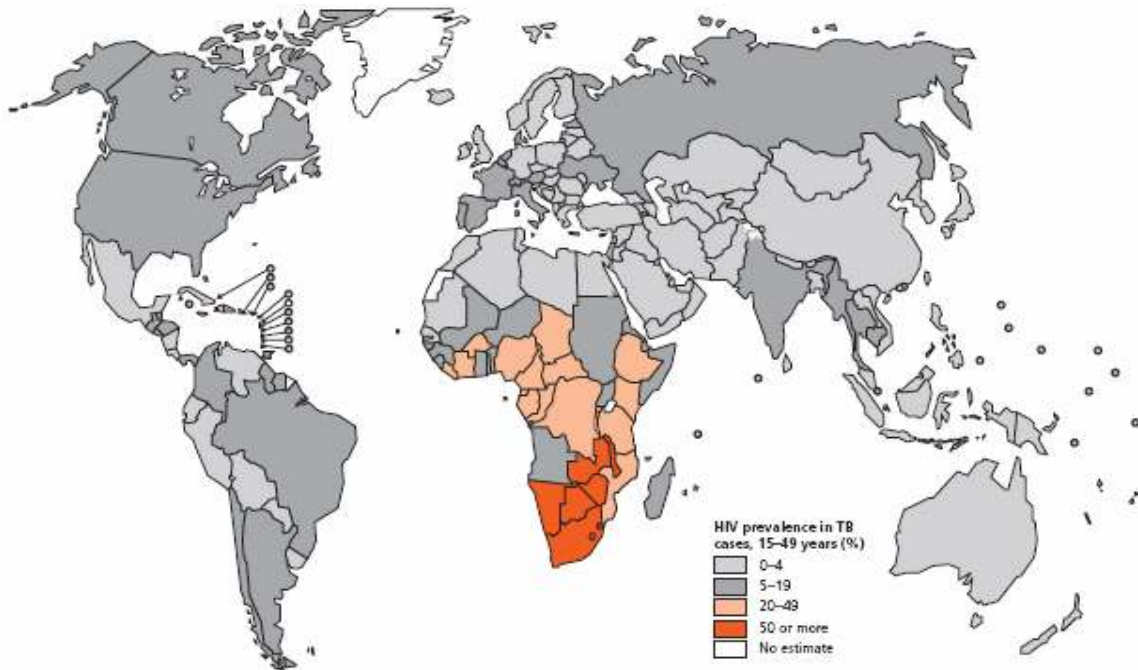


Figura 4: Estimativa de prevalência de HIV em casos novos de TB em adultos em 2004. Fonte: WHO, 2006.

### 1.10.3 Tuberculose multirresistente

A TB multirresistente às drogas (MDR-TB) é mais comum em pessoas com co-infecção pelo HIV do que naqueles somente com TB (CDC, 1998). Alguns fatores têm sido relacionados a esse maior risco de adquirir MDR-TB: alta proporção de doença resultante de infecções recentes por cepas MDR (SMALL *et al.*, 1994; ALLAND *et al.*, 1994), má absorção de drogas antituberculose orais na população infectada pelo HIV (PELOQUIN; MACPHEE; BERNING, 1993) e maior oportunidade de adquirir TB devido à aglomeração de pessoas e maior número de visitas hospitalares (FRIEDEN *et al.*, 1993; CORONADO *et al.*, 1993; EDLIN *et al.*, 1992; BUSILLO *et al.*, 1992).

### 1.11 Importância do estudo:

São escassos os dados sobre a investigação dos fatores de risco para tuberculose em pacientes co-infectados com HIV. A importância das doenças isoladamente do ponto de vista de morbimortalidade, a gravidade dos dados produzidos pela co-infecção, a necessidade de informações para o embasamento do planejamento e desenvolvimento de programas que visem a prevenção e o controle dessas patologias, tornam eminente a realização de estudos epidemiológicos sobre a co-infecção, principalmente a nível regional, onde estudos a esse respeito são escassos, citando-se apenas as publicações de Kerr-Pontes, Oliveira e Freire (1997), em pacientes co-infectados TB/HIV, e de Barroso *et al.* (2001; 2003) realizados na população geral.

Além disso, atualmente, no Ceará, não existem laboratórios públicos que realizem a identificação das micobactérias ao nível de espécies, sendo necessário o envio de amostras para outros centros quando se planeja proceder tal identificação, levando um tempo excessivo entre a coleta do exame e retorno do resultado, com conseqüente prejuízo para o paciente.

Outra informação sobre a qual também ainda inexistem estudos no Ceará refere-se ao perfil de sensibilidade de *M. tuberculosis* nos pacientes infectados pelo HIV, com análise da multirressistência.

Portanto, informações quanto às espécies de micobactérias mais freqüentes, assim como quanto ao perfil de sensibilidade do *M. tuberculosis* nos pacientes infectados pelo HIV, são importantes para orientar os médicos no tratamento e manejo desses pacientes. Assim, esse trabalho é importante, pois fornecerá informações que servirão de orientação, a nível regional, para o manejo prático dos pacientes co-infectados atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas, centro regional de referência em infectologia. Além disso, fornecerá informações e servirá como incentivo para a implementação da técnica PRA para a identificação de NTM no estado do Ceará.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

- Caracterizar o perfil epidemiológico dos pacientes co-infectados com micobactérias e HIV atendidos no período de julho de 2003 a junho de 2006 no hospital de referência para tratamento de HIV/aids, Hospital São José de Doenças Infecciosas, em Fortaleza, Ceará e identificar os padrões de resistência do bacilo às drogas anti-tuberculose.

### 2.2 Objetivos específicos

- Traçar o perfil epidemiológico dos pacientes co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis*/HIV;
- Fazer a identificação molecular das cepas de micobactérias não-tuberculose, classificadas previamente por provas bioquímicas, para identificação de espécies através da técnica PRA (*PCR-restriction endonuclease analysis*);
- Analisar os possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de TB em pacientes infectados com o vírus HIV.
- Analisar os padrões de sensibilidade a drogas antituberculose dos isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* dos pacientes co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis*/HIV;
- Verificar a incidência de cepas resistentes a drogas antituberculose, inclusive do tipo MDR (*multidrug-resistant*), correlacionando com falha de tratamento e tratamento prévio;

### **3. Materiais e métodos:**

#### **3.1 Tipo de estudo:**

Trata-se de um estudo caso-controle, retrospectivo, não-pareado, onde serão avaliados os pacientes co-infectados com micobactérias e HIV atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) no período de julho 2003 até junho de 2006. O HSJ é um hospital-escola de referência em doenças infecciosas para todo o estado do Ceará, localizado no nordeste do Brasil, sendo composto por 118 leitos de internamento e com atendimento médio no ambulatório de HIV/SIDA de 2611 pacientes por mês no ano de 2006. O HSJ é o hospital de referência para pacientes infectados com HIV na nossa região e faz o tratamento de pacientes co-infectados com TB, apesar de não ser um centro de referência para TB.

#### **3.2 População de estudo:**

Foram estudados 208 pacientes atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas co-infectados com micobactérias e HIV. De cada paciente, os seguintes dados contidos em prontuários foram coletados: idade, sexo, estado civil, profissão, procedência, condição sócio-econômica, uso de bebidas alcoólicas, tabagismo, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, classificação clínica da infecção pelo HIV, tratamento prévio de tuberculose, tuberculose ativa, teste cutâneo de PPD (tuberculina), tratamento antiretroviral, forma clínica da micobacteriose, drogas usadas no tratamento contra tuberculose ou imunoprolifáticas contra tuberculose, dados laboratoriais (dosagem de CD4+, carga viral e espécie de micobactéria isolada com TSA) e evolução clínica. Deste modo empregou-se questionário, contido no anexo I, que foi preenchido pelo pesquisador buscando informações contidas nos prontuários. Foram coletadas informações de 208 pacientes que preenchiam os critérios de inclusão. A população controle foi constituída por 103 pacientes infectados pelo HIV e sem infecção por micobactérias selecionados aleatoriamente entre os pacientes atendidos no mesmo serviço de saúde.

#### **3.3 Critério de inclusão e exclusão:**

Foram incluídos neste estudo pacientes com diagnóstico concomitante de micobacteriose tuberculosa e não-tuberculosa e infecção pelo HIV, independente do sexo. Foram

incluídos somente casos com diagnóstico clínico e/ou microbiológico através do isolamento de micobactéria em meio Löwestein-Jensen (LJ) e por exame direto das amostras.

Foram excluídos, desde o início do estudo, pacientes acompanhados em outras instituições, gestantes e crianças menores de dois anos. As crianças foram excluídas devido a freqüente incerteza em relação ao diagnóstico da infecção pelo HIV observada para esta faixa etária. Pacientes com diagnóstico inicial presuntivo de micobacteriose, mas que posteriormente se revelarem portadores de outra patologia ou que não foram confirmados, também foram excluídos.

### **3.4 Definição de casos:**

Em relação ao diagnóstico da infecção pelo HIV e definição dos casos de aids, este estudo seguiu as orientações contidas na Portaria N°. 59/GM/MS, do Ministério da Saúde do Brasil, de 28 de janeiro de 2003 e no manual “Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças”, também do Ministério da Saúde do Brasil, publicado em 2004. O estadiamento da infecção pelo HIV foi feito com base em dados clínicos e laboratoriais conforme os últimos critérios do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; CDC, 1992).

Foi definido portador de infecção pelo HIV todo paciente com dois (2) testes de triagem reagentes ou um (1) confirmatório para detecção de anticorpos anti-HIV. São testes de triagem para detecção de anticorpos anti-HIV: ensaio por imunoadsorção ligado à enzima (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), ensaio imunoenzimático (*Enzyme Immuno Assay*, EIA), ensaio imunoenzimático com micropartículas (*Microparticle Enzyme Immuno Assay*, MEIA) e ensaio imunoenzimático com quimioluminescência. São testes confirmatórios: imunofluorescência indireta, imunoblot, *Western Blot*, teste de amplificação de ácidos nucleicos como, por exemplo, a reação em cadeia polimerase (*Polimerase Chain Reaction*, PCR) e a amplificação seqüencial de ácidos nucleicos (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*, NASBA).

Os critérios de definição de caso de aids estão descritos na figura 5:

Em relação aos aspectos diagnósticos e terapêuticos da tuberculose, este estudo adotou todas as definições contidas no Manual Técnico para o Controle da Tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Algumas destas definições estão apresentadas abaixo. Em termos gerais e de acordo com o referido manual, define-se como caso de tuberculose “todo indivíduo com diagnóstico confirmado por baciloscopia ou cultura e aquele em que o médico,

com base nos dados clínico-epidemiológicos e no resultado de exames complementares, firma o diagnóstico de tuberculose” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). A partir desta definição de caso, foram ainda identificados casos confirmados e casos suspeitos e o sítio envolvido.

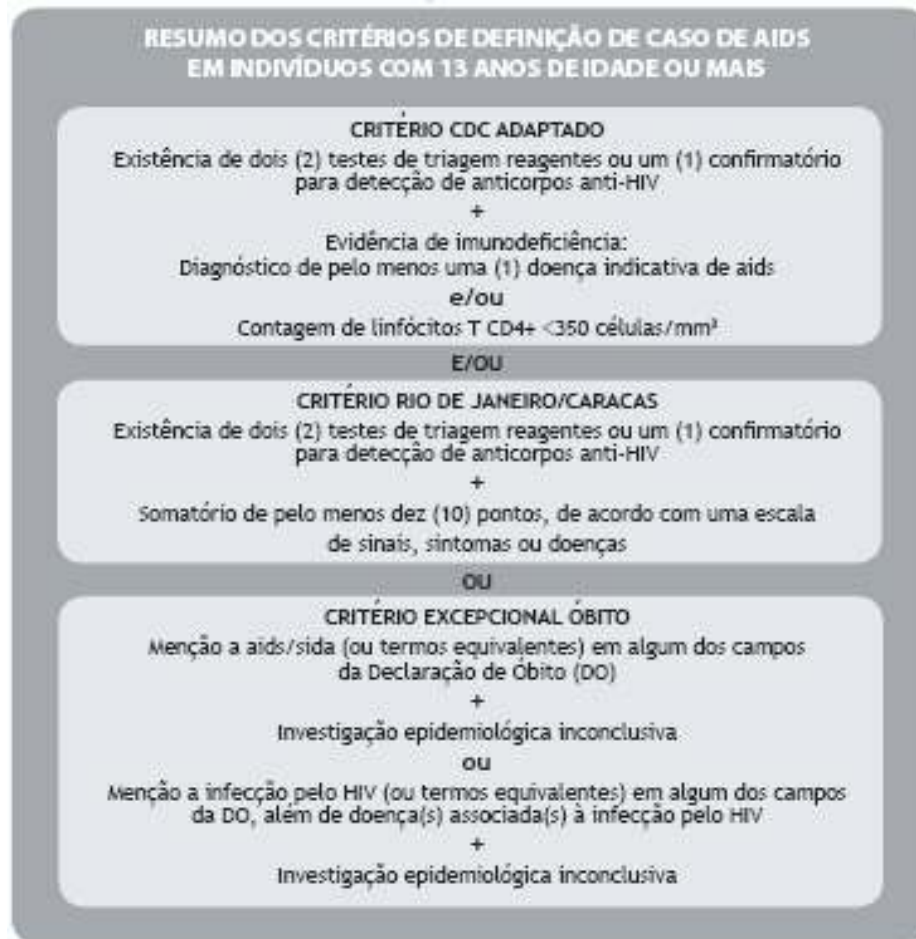


Figura 5: Critérios de definição de caso de aids. Nota explicativa: Define-se como investigação epidemiológica inconclusiva aquela em que, após a busca em prontuários, o caso não puder ser descartado ou enquadrado num dos critérios principais, pelo não registro de dados clínico-laboratoriais. Fonte: Ministério da Saúde, 2004.

Para os casos de tuberculose pulmonar, foram revisados os seguintes elementos diagnósticos: história clínica, exame físico, baciloscopia direta do escarro, cultura do escarro, exame radiológico e prova tuberculínica. Um caso confirmado de tuberculose pulmonar foi definido como o que apresentar: (a) duas baciloskopias diretas positivas, ou (b) uma baciloscopia direta positiva e cultura positiva, ou (c) uma baciloscopia direta positiva e imagem radiológica

sugestiva de tuberculose. Um caso suspeito de tuberculose pulmonar foi aquele em que os critérios acima não foram preenchidos e o diagnóstico havia sido formulado com base nos dados clínico-epidemiológicos e no resultado de exames complementares não confirmatórios (Ministério da Saúde, 2002).

Para os casos de tuberculose extrapulmonar, foram revisados os seguintes elementos diagnósticos: história clínica, exame físico, baciloscopia direta e cultura de amostras específicas (secreções, urina, líquido pleural, líquido peritoneal, LCR e outros), exames de imagem (radiológico, ultra-sonografia, etc.), exames histopatológicos e prova tuberculínica. Um caso confirmado de tuberculose extrapulmonar foi aquele em que tenha havido isolamento de micobactérias em cultura de líquido (exceto sangue e medula óssea) ou tecido (por exemplo: urina, LCR, gânglio, pleura, etc.), ou exame histológico com alterações patológicas compatíveis associadas à visualização de bacilo álcool-ácido resistente no tecido (gânglio, pleura, etc.). Um caso suspeito de tuberculose extra-pulmonar foi aquele em que os critérios acima não foram preenchidos e o diagnóstico havia sido formulado com base em dados clínico-epidemiológicos e no resultado de exames complementares não confirmatórios (Ministério da Saúde, 2002).

Um caso de tuberculose disseminado foi definido como aquele em que tenha havido isolamento de micobactérias em cultura de sangue e/ou medula óssea e/ou em dois ou mais sítios (FITZGERALD; HAAS, 2005)

Os casos de micobacteriose não-tuberculosa foram definidos como os pacientes que apresentaram alguns dos seguintes sintomas e sinais: febre, sudorese noturna, perda ponderal, diarreia, dor abdominal, hepatoesplenomegalia ou linfadenopatias, nos quais foram isolados micobactérias não-tuberculosas através de cultura de líquidos e tecidos. Nos casos oligossintomáticos, foi considerado micobacteriose não-tuberculose quando houve isolamento de NTM em, no mínimo, 2 amostras clínicas colhidas do mesmo sítio anatômico.

### **3.5 Outras definições:**

Em relação aos exames radiológicos de tórax para casos de tuberculose pulmonar, a interpretação foi a contida no Manual Técnico para o Controle da Tuberculose (Ministério da Saúde, 2002) que é a seguinte: 1. Normal, quando não apresentarem imagens patológicas nos campos pleuropulmonares; 2. Seqüela, quando apresentarem imagens sugestivas de lesões cicatriciais; 3. Suspeito, quando apresentarem imagens sugestivas de tuberculose; 4. Outras doenças, quando apresentarem imagens sugestivas de pneumopatias não-tuberculosa (infecções

bacterianas, micoses, abscessos ou neoplasias). A interpretação foi realizada com base no laudo do radiologista do Setor de Imagem do Hospital São José de Doenças Infecciosas.

Em relação à prova tuberculínica, quando realizada, a interpretação dada foi a mesma contida no Manual Técnico para o Controle da Tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002) para portadores de infecção pelo HIV: não reator (PPD de 0 a 4 mm) e reator (PPD > 4 mm).

No que diz respeito ao tratamento, foi considerado “caso novo” ou sem tratamento os pacientes que nunca se submeteram à quimioterapia antituberculose, ou que fizeram uso de drogas anti-tuberculose por menos de 30 dias, ou submeteram-se ao tratamento para tuberculose há cinco anos ou mais. Foi definido como re-tratamento a prescrição de esquema de drogas para o doente já tratado por mais de 30 dias que veio necessitar de nova terapia por recidiva após cura, retorno após abandono ou por falência do esquema básico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Abandono foi definido para o caso em que o doente, depois de iniciado o tratamento para tuberculose, deixou de comparecer ao HSJ por mais de 30 dias consecutivos após a data aprazada para seu retorno. Caso de recidiva foi definido para o paciente com tuberculose em atividade que já se tratou anteriormente e recebeu alta por cura, desde que o período entre a cura e o diagnóstico de recidiva não houvesse ultrapassado cinco anos. Se esse intervalo excedeu cinco anos, o caso foi considerado como “caso novo”. Caso de falência foi definido para o paciente com tuberculose pulmonar em que a baciloscopia direta do escarro persistiu positiva ao final do 4º ou 5º mês de tratamento, independente de ter havido ou não negatificação anterior, desde que o mesmo não estivesse vindo apresentando melhora clínica e radiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Em relação ao encerramento do tratamento, foram adotados os critérios contidos no Manual Técnico para o Controle da Tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Foram registrados os seguintes tipos de alta: por cura, por completar o tratamento, por abandono de tratamento, por mudança de diagnóstico, por óbito, por falência e por transferência.

Em relação à classificação de multirresistência, foram classificados como portadores de tuberculose multirresistente (MDR-TB) os pacientes portadores de bacilos resistentes a mais de duas drogas, incluindo rifampicina (R) e isoniazida (H) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

O tempo de infecção pelo HIV foi definido como o período, em meses, entre a data do primeiro exame com resultado reagente para o diagnóstico da infecção pelo HIV até a data de diagnóstico da micobacteriose.

### **3.6 Definição do controles:**

O grupo controle foi constituído de 103 pacientes selecionados aleatoriamente, independente do sexo e estágio clínico de infecção pelo HIV, entre os pacientes atendidos no ambulatório do HSJ no período de realização da pesquisa. Foram selecionados os dois primeiros pacientes marcados para os médicos do ambulatório de atendimento, nas segundas e sextas-feiras. A proporção de pacientes em cada um dos meses foi similar. Foram excluídos os pacientes com diagnóstico de micobacteriose ou que estivessem em investigação clínica de patologias em que micobacterioses estivessem entre as possibilidades diagnósticas.

### **3.7 Aspectos éticos:**

Aos sujeitos do estudo foram garantidos o sigilo das informações e o anonimato, de acordo com as normas éticas da investigação científica. Os nomes dos pacientes não foram relacionados aos questionários e foram identificados apenas por códigos. Este projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas e recebeu parecer favorável à sua execução no dia 13 de fevereiro de 2006 através do protocolo n°. 034/2005 (anexos II).

### **3.8 Processamento e cultivo primário dos isolados clínicos:**

Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Hospital São José de Doenças Infecciosas.

Aos pacientes infectados pelo HIV atendidos neste serviço, ao procurarem espontaneamente atendimento médico, quando aventado a possibilidade diagnóstica de micobacteriose, foram solicitados pelos médicos assistentes a realização de exames microbiológicos para investigação clínica. Não houve interferência do pesquisador na realização das solicitações, sendo, portanto, os exames realizados na rotina do serviço, sem ônus para a instituição.

As amostras coletadas na instituição ou no domicílio do paciente eram imediatamente entregues no laboratório do HSJ, onde foram prontamente processadas.

### 3.8.1 Cultivo das amostras

O cultivo das amostras foi realizado em capela de fluxo laminar com pressão negativa. Antes do início do procedimento a cabine era limpa com álcool a 70% e submetido à luz ultravioleta por 20 minutos.

As amostras clínicas foram processadas para o cultivo primário em meio Löwestein-Jensen (LJ) puro e em Löwestein-Jensen acrescido do agente inibidor ácido para-nitrobenzóico (PNB) que é uma prova bioquímica para identificação de micobactérias não-tuberculose. As bactérias do complexo *M. tuberculosis* não apresentam crescimento na presença do agente inibidor PNB, enquanto as micobactérias não-tuberculose crescem em PNB.

As amostras de escarro e de outros sítios não-estéreis foram descontaminadas pelo método de 1% N-acetil-L-cisteína (NALC)-hidróxido de sódio (NaOH) antes do cultivo em meio sólido (PFYFFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JUNIOR, 2003). Este tratamento tem como finalidade eliminar microorganismos contaminantes e liquefazer o muco contido no escarro. Ao final, uma solução de citrato de sódio 5M, cuja finalidade é estabilizar o NALC, foi adicionada à mistura.

O sedimento das amostras clínicas descontaminadas foi semeado em agar Löwestein-Jensen e incubado à 37°C por até oito semanas. Todavia, amostras que tiveram baciloscopia positivas foram incubadas por até 12 semanas. As amostras clínicas provenientes de sítios anatômicos estéreis não foram descontaminadas, sendo, portanto, coradas pelo Ziehl-Neelsen e cultivadas *in natura*.

Os isolados bacterianos foram estocados a -70 °C em meio Tryptic Soy Broth suplementado com glicerol. As culturas positivas eram enviadas ao Laboratório Central do Estado do Ceará (LACEN) para a realização dos testes de sensibilidade às drogas.

### 3.9 Teste de sensibilidade a drogas antimicrobianas pelo Método das Proporções (CANETTI *et al.*, 1963) (para *M. tuberculosis*):

Esta etapa do estudo foi realizada em cabine de fluxo laminar tipo IIb, com pressão negativa, localizado no Setor de Micobactérias do Laboratório Central do Estado do Ceará.

Antes do início do procedimento, a cabine era limpa com glutaraldeído 2% e submetida à luz ultravioleta por 20 minutos. Eram utilizadas as medidas de biossegurança adequadas como o uso máscara com filtro N-95, luvas, aventais e gorros.

Inicialmente foi feita uma suspensão de colônias de micobactérias isoladas em cultura pura equivalente à escala um de MacFarland. A suspensão foi feita em solução salina (NaCl 0,9%) contendo Tween 80 (0,1%), e em seguida diluído serialmente até  $10^{-4}$ , sendo as suspensões homogeneizadas em vortex. As drogas foram adicionadas em concentrações específicas ao ágar Löwestein-Jensen conforme descrito no quadro 4.

Tubos para cada droga a serem testadas foram inoculados com 0,1mL de cada diluição da amostra ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ). Tubos sem drogas também foram inoculados com amostras, a fim de serem comparados na interpretação do resultado. Os inóculos foram deixados secar ao ar dentro da capela de fluxo laminar antes de serem incubados a 37 °C por três semanas. Quando houve dúvida da pureza das amostras estas foram inoculadas em ágar- sangue sem antibióticos.

A leitura dos tubos foi feita quando houve crescimento de 50 a 150 unidades formadoras de colônias (ufc) no controle sem-droga. A interpretação foi dada pelo número de ufc nos tubos com droga, e os números de ufc observados foram anotados em percentual em relação aos respectivos tubos sem droga. A resistência à determinada droga, àquela concentração testada, foi reportada quando o percentual de colônias for superior ou igual a 1% sob concentrações críticas das drogas (CANETTI *et al.*, 1963).

Quadro 3. Concentrações das drogas empregadas no Método das Proporções.

<b>Droga</b>	<b>Concentração das drogas (µg/ml) em ágar Lowestein-Jensen</b>
Rifampicina (R)	40
Isoniazida (H)	0,2
Pirazinamida (Z), pH 5,9	100
Etambutol (E)	2
Estreptomicina (S)	4

### **3.10 Identificação molecular:**

Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias do Departamento de Patologia e Medicina Legal e no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular no Departamento de Biologia, ambos da Universidade Federal do Ceará.

Foram utilizadas as amostras previamente classificadas como micobactérias não-tuberculose através de provas bioquímicas descritas previamente. Quatro amostras foram subcultivadas em meio Middlebrook suplementado com ADC (*Albumin Dextrose Catalase*) com o objetivo de aumentar a massa bacteriana e ter colônias jovens. Antes da etapa de extração foram realizadas lâminas de amostra de colônias que foram coradas pelo método Ziehl-Neelsen com o intuito de confirmar a pureza das colônias.

### 3.10.1 Extração do DNA

Esta etapa do estudo foi realizada em capela de fluxo laminar, tipo IIB, do laboratório de nível de biossegurança 3, localizado no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará.

Antes do início do procedimento, a cabine de fluxo laminar foi limpa com glutaraldeído 2% e submetida à luz ultravioleta por 20 minutos, juntamente com o material a ser utilizado na extração. Foram utilizadas as medidas de biossegurança adequadas como o uso máscara com filtro N-95, luvas, aventais e gorros. Nesta etapa, o material reutilizável era descartado em solução de hipoclorito de sódio a 5% e o material descartável era colocado em lixo especial para posterior autoclavagem.

O DNA cromossômico foi extraído de uma suspensão de micobactérias empregando a técnica publicada por Leão *et al.* (2004). Na primeira etapa, as amostras em meio Middlebrook foram centrifugadas a 5000rpm durante 20 minutos em centrífuga refrigerada a 20°C (Modelo 2K15 – SIGMA). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com 20 mL de PBS por centrifugação a 5000rpm durante 20 minutos na centrífuga descrita anteriormente. O sobrenadante foi mais uma vez desprezado e o sedimento ressuspensado em 200 µL de PBS foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5mL.

A segunda etapa teve por objetivo a inativação das micobactérias, sendo realizada por aquecimento das amostras a 80°C por 20 minutos em banho-maria. Após a inativação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 minutos em centrífuga refrigerada a 20°C (Modelo 2K15 – SIGMA) para sedimentação do material celular. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi lavado com salina a 3% através de nova centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos na centrífuga já referida. O sobrenadante foi novamente desprezado.

Após a lavagem, as micobactérias foram submetidas a dois métodos para quebra da parede celular. As bactérias foram ressuspensas em 500µL de tampão TE-Triton 1% e os tubos de microcentrífuga foram lacrados com parafilme para evitar rompimento da tampa durante o próximo procedimento. A seguir eram realizados três ciclos de 10 minutos de aquecimento a 100°C em banho-maria seguidos por congelamento durante 10 minutos em *freezer* a -70°C (THERMO ELECTRON CORPORATION, modelo: Forma -86 C - ULT Freezer).

A seguir os tubos contendo DNA genômico dispersos no sobrenadante e material celular no sedimento eram estocados a -20°C, até o momento do uso.

A concentração de DNA das amostras que foram submetidas ao PRA foi medida em espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA Calculator (GE Healthcare). As amostras foram diluídas em água milli-Q estéril na razão de 1:10 e a concentração foi medida na absorbância de 260nm empregando a seguinte fórmula:  $C = (A_{260}) \times 50 \times \text{diluição}$  (C= ng/µL ou µg/mL).

### 3.10.2 PCR

Foi utilizada a técnica denominada PRA descrita por Telenti *et al.* (1993b), que se baseia na amplificação do gene *hsp65* realizada com os iniciadores Tb11 e Tb12 (INVITROGEN) (quadro 5).

A amplificação foi realizada utilizando 500ng de DNA cromossômico adicionado 19,75 µl de mix de PCR composto por 2,5µl de tampão 10x (INVITROGEN) adicionado de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, DMSO 5%, dNTPs cada um em uma concentração final de 200 µM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1,0 µM de cada iniciador (Tb11 e Tb12), 1U de Taq DNA polimerase (Cembiot) e água milli-Q em quantidade suficiente para completar 25µl.

A amplificação foi realizada no termociclador TPC-200 - MJ RESEARCH e envolveu desnaturação inicial das fitas de DNA por 5 minutos a 95 °C e 45 ciclos com os seguintes passos: 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 65 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C e mais 1 ciclo de extensão por 1 min a 72 °C. Após o término as amostras eram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador e armazenadas a -20°C. O produto obtido era de 441 pb.

Quadro 4: Iniciadores da PCR:

Iniciadores	Seqüência (5' – 3')
Tb11	ACCAACGATGGTGTGTCCAT
Tb12	CTTGTCGAACCGCATAACCT

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% para confirmação da amplificação. Para tanto, 5µl dos produtos da PCR foram misturados a 2µl de tampão de carregamento 6X e aplicados em um gel de agarose 1% preparado com TBE 1X (ver anexo 1) contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. O brometo de etídio permite a visualização de bandas de DNA sob luz ultravioleta. O procedimento de descarte de géis e tampão contaminados com o brometo de etídio foi baseado na publicação de Lunn e Sansone (1987). Foi utilizado o marcador de peso molecular ΦX 174RF DNA/ *Hae* III (INVITROGEN) para comparação do tamanho das bandas. A eletroforese foi desenvolvida a 90V (PHARMACIA - BIOTEC) por aproximadamente 2 horas e as bandas foram visualizadas através de iluminação ultravioleta.

### 3.10.3 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Após a confirmação da amplificação do gene *hsp65*, frações dos produtos da PCR foram submetidos à digestão enzimática separadamente com as enzimas *Hae*III e *Bst*EII. O quadro 6 mostra as enzimas de restrição utilizadas e seus sítios de restrição.

Na reação com a *Hae*III, 10µl do produto da PCR foi adicionado a uma mistura contendo 9,5µl de água destilada milli-Q, 2,5µl do tampão da B5 10X, 2,5µl do tampão BSA 10X e 5 unidades da enzima *Hae*III (10U/µl) (JENA BIOSCIENCE). A mistura foi incubada a 37°C durante 3 horas no termociclador TPC-200 - MJ RESEARCH.

Na reação com a *Bst*EII, 10µl do produto da PCR foi adicionado a uma mistura contendo 9,5 µl de água destilada milli-Q, 2,5µl do tampão da *Bst*EII 10X, 2,5µl do tampão BSA 10X e 5 unidades da enzima *Bst*EII (10U/µl) (JENA BIOSCIENCE). A mistura foi incubada a 60°C durante 3 horas no termociclador TPC-200 - MJ RESEARCH.

Depois da digestão, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose MethaPhor a 3% para visualização de bandas. Para tanto, 5µl dos produtos da PCR foram misturados a 2µl de tampão de carregamento 6X e aplicados em um gel de agarose MetaPhor 3% (COMBEX BIOSCIENCE ROCKLAND) preparado com TAE 1× contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. Foram utilizados dois marcadores de peso molecular, de 25 e 50 pb (INVITROGEN). A eletroforese foi desenvolvida a 90V (PHARMACIA - BIOTEC) por aproximadamente 2 horas

Quadro 5: Sítio de restrição das enzimas empregadas no PRA. A letra N representa as bases nucleopeptídicas A, C, G ou T.

<b>Enzima de restrição</b>	<b>Seqüência alvo</b>	<b>Sítio de restrição</b>
<i>HaeIII</i>	5'...GGCC... 3' 3'...CCGG...5'	5'...GG▼CC... 3' 3'...CC▼GG...5'
<i>BstEII</i>	5'...GGTNACC...3' 3'...CCANTGG...5'	5'...G▼GTNACC...3' 3'...CCANTG▼G...5'

Os tamanhos dos fragmentos foram estimados visualmente em luz ultravioleta por comparação com marcador de peso molecular de 25 e 50pb e comparados com os padrões publicados por Leão *et al.* (2004) e descritos na figura 6.

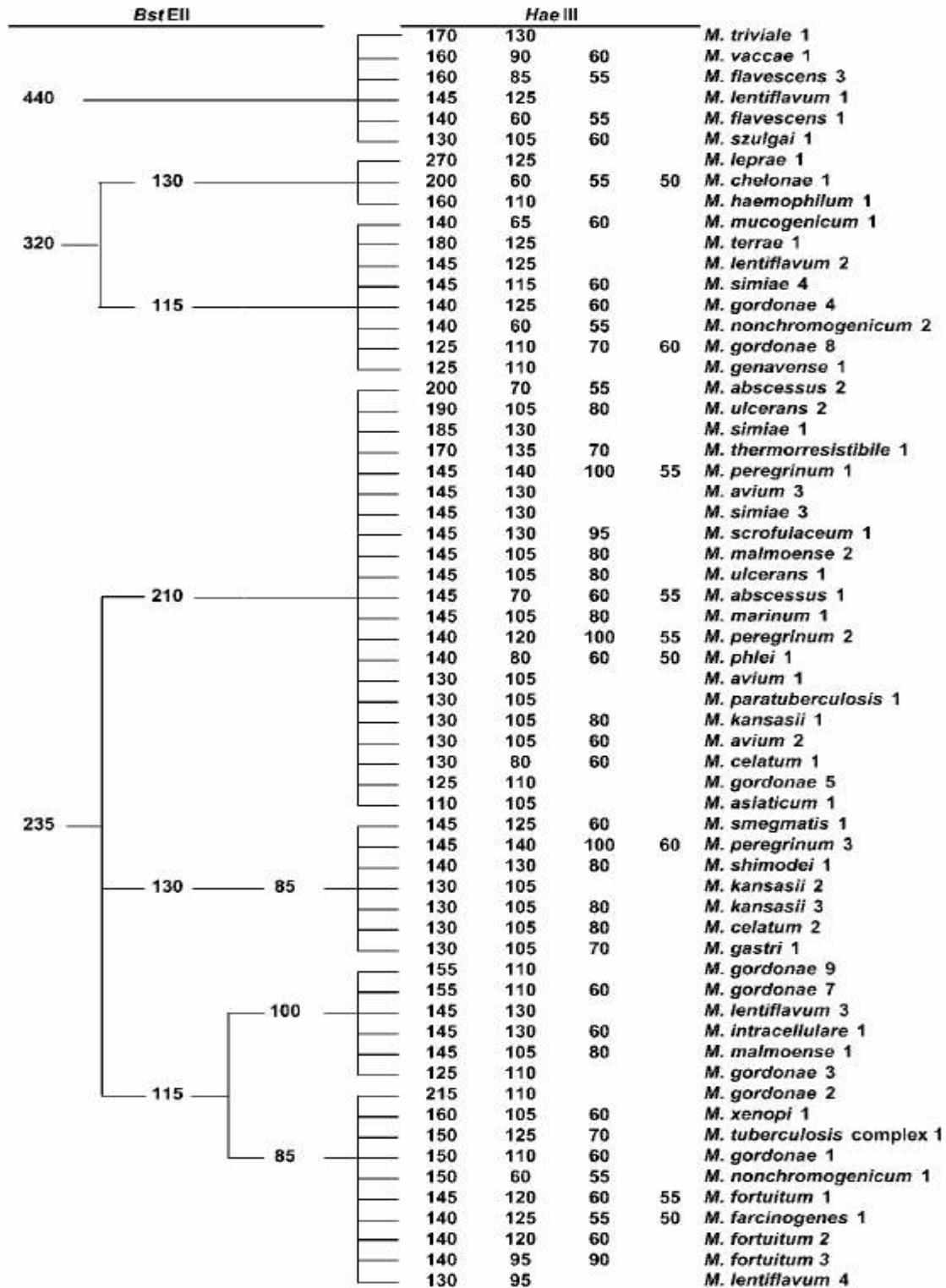


Figura 6: Algoritmo de identificação dos padrões de PRA. Os valores representam o tamanho dos fragmentos das digestões enzimáticas em pares de bases. À esquerda estão os fragmentos da

digestão enzimática com a enzima *BstEII*. À direita estão os fragmentos da digestão enzimática com a enzima *HaeIII*. Fonte: Leão *et al.* (2004)

### **3.11 Análise estatística:**

Os dados foram inseridos usando o EXCEL para Windows (versão 2000) e transferidos para o SPSS (um programa estatístico). O Teste t de Student foi usado para comparar as medias de variáveis contínuas. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney também foi usado para comparar dados com alta assimetria. Análise univariada das associações clínico-laboratoriais e das variáveis categóricas sócio-demográficas foram realizadas usando o teste qui-quadrado e o teste de Fisher, estimando o odds ratios (OR) com seus respectivos intervalos de confiança 95% (CI).

## 4. Resultados

Foram analisados, no período de julho de 2003 até junho de 2006, 208 pacientes com diagnóstico clínico, com ou sem confirmação laboratorial, de micobacteriose ou tuberculose e infecção pelo HIV atendidos no HSJ, tanto a nível ambulatorial como nas unidades de internamento. O grupo controle foi constituído por 103 pacientes com infecção pelo HIV e sem micobacteriose ou tuberculose atendidos no mesmo serviço durante o mesmo período. Algumas informações não puderam ser colhidas de todos os pacientes por faltarem informações nos prontuários. Portanto, alguns dados não puderam ser observados e/ou comparados em número igual ao equivalente total do grupo.

A média de idade entre os pacientes co-infectados foi de 40 anos, com desvio-padrão de 10,85 anos, variando de 16 a 78 anos de idade, enquanto que a média de idades entre os pacientes do grupo controle foi de 36 anos, com desvio-padrão de 10,61 anos. Além disso, nos pacientes co-infectados, houve uma maior concentração entre adultos com idades entre 25 a 49 anos englobando 81,64% dos pacientes. Foi observado que os pacientes co-infectados micobacteriose/HIV apresentavam idade superior aos pacientes do grupo controle ( $p= 0,0025$ ), tendo em média 4 anos a mais. A figura 7 mostra a distribuição de idades entre os grupos estudados.

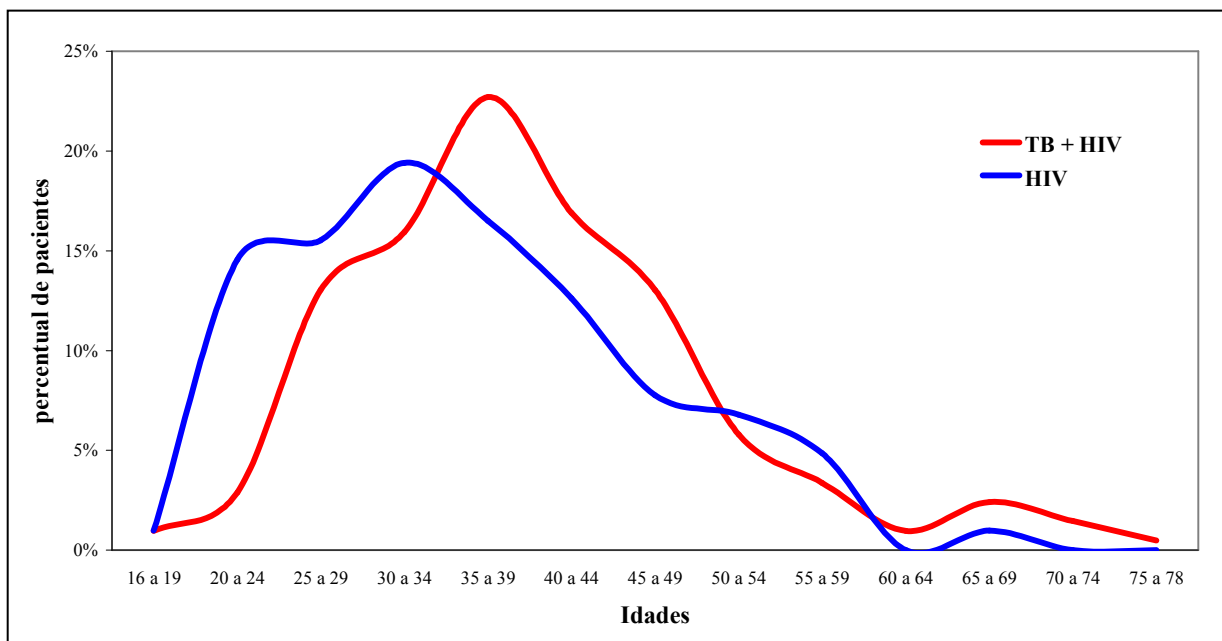


Figura 7: Gráfico de distribuição percentual das idades, por faixas etárias, em anos, entre os pacientes co-infectados e os controles.

Entre os pacientes co-infectados a maioria era do sexo masculino (80,77%), sendo este percentual estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle ( $p= 0,0005$ ). O sexo feminino representou somente 19,23% da população em estudo. Desta forma, o sexo masculino configura-se como um fator de risco para o desenvolvimento de TB em pacientes infectados pelo HIV, sendo o risco relativo 43,02% superior ao do sexo feminino (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos pacientes por sexo entre os pacientes co-infectados e os controles.

<b>Sexo</b>	<b>TB + HIV n (%)</b>		<b>HIV n (%)</b>		<b>RR</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>p-valor</b>
Masculino	168	80,77	64	62,14	1,4302	2,5594	0,0005
Feminino	40	19,23	39	37,86			
Total	208	100	103	100			

RR - Risco Relativo.

A tabela 2 mostra a distribuição dos pacientes quanto ao estado civil e nela é mostrado que a maioria dos pacientes é solteira, sejam eles co-infectados ou não. Assim sendo, a tabela 3 foi construída com o objetivo de analisar esta possível variável como fator de risco para micobacteriose e mostra a comparação entre o estado civil solteiro e as outras categorias (casados, divorciados e viúvos). Observou-se um percentual maior de solteiros no grupo dos pacientes co-infectados ( $p= 0,0607$ ), sendo o risco relativo 19,25% superior aos demais grupos analisados em conjunto.

Tabela 2: Distribuição dos pacientes quanto ao estado civil entre os pacientes co-infectados e os controles.

<b>Estado civil</b>	<b>TB + HIV n (%)</b>		<b>HIV n (%)</b>	
Solteiro	149	73,04	60	61,86
Casado	49	24,02	21	21,65
Divorciado	3	1,47	12	12,37
Viúvo	3	1,47	4	4,12
Total	204	100	97	100
SI	4		6	

SI: sem informações

Tabela 3: Distribuição de estado civil dos pacientes, comparando solteiros com não-solteiros, entre os pacientes co-infectados e os controles.

<b>Estado civil</b> <b>Solteiro</b>	<b>TB + HIV n (%)</b>		<b>HIV n (%)</b>		<b>RR</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>p-valor</b>
Sim	149	73,04	60	61,86	1,1925	1,6706	0,0607
Não	55	26,96	37	38,14			
Total	204	100	97	100			
SI	4		6				

RR - Risco Relativo; SI: sem informações

Quanto à procedência do paciente, observou-se não haver diferenças estatisticamente significantes ( $p= 0,3168$ ) entre os grupos analisados, apesar de haver um percentual maior de pacientes (60,40%) da capital do estado comparado com os do interior do estado.

O nível de escolaridade, informação usualmente empregada na caracterização do nível sócio-econômico, foi significativamente baixo, tendo 85,94% dos pacientes co-infectados estudado menos de 8 anos durante toda a vida (ensino fundamental incompleto). Comparando essa informação com o grupo controle, o percentual de pacientes com baixa escolaridade foi maior ( $p<0,0001$ ) entre os pacientes co-infectados TB-HIV. Além disso, o risco de adquirir TB foi duas vezes maior neste grupo em relação aos pacientes com maior escolaridade ( $\geq 8$  anos de estudo) (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição dos pacientes em relação à escolaridade (tempo de estudo em anos) entre os pacientes co-infectados e os controles.

<b>Escolaridade</b>	<b>TB + HIV n (%)</b>		<b>HIV n (%)</b>		<b>RR</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>p-valor</b>
< 8 anos	165	85,94	36	48,00	2,0066	6,6204	0,0000
$\geq 8$ anos	27	14,06	39	52,00			
Total	192	100	75	100			
SI	16		28				

RR - Risco Relativo; SI: sem informações.

Investigando-se outro aspecto relacionado ao nível sócio-econômico, foi observado, como demonstrado na tabela 5, que a maior parte dos pacientes co-infectados vive em situação de pobreza, com renda igual ou inferior a 1 salário mínimo (71,59%). Todavia, não existe diferença estatisticamente significativa quando se compara este dado com o do grupo controle ( $p=0,7899$ ), refletindo somente a situação de renda da população infectada pelo HIV.

Tabela 5: Distribuição dos pacientes quanto à renda mensal em salários mínimos entre os pacientes co-infectados e os controles.

<b>Renda*</b>	<b>TB + HIV n (%)</b>		<b>HIV n (%)</b>	
Sem renda	27	15,34	7	13,73
≤ 1	99	56,25	27	52,94
> 1	50	28,41	17	33,33
Total	176	100	51	100
SI	32		52	

\* No de salários mínimos; SI: sem informações.

Em relação ao tabagismo, não existiu diferença estatisticamente significativa no percentual de pacientes fumantes entre os grupos de pacientes analisados ( $p=1,0000$ ) (Tabela 6). De forma contrária, houve uma maior número de pacientes que relatavam história de etilismo no grupo controle ( $p=0,0003$ ), eles representavam 57,95% dos pacientes deste grupo contra 34,5% no grupo dos pacientes co-infectados TB-HIV (Tabela 6).

Algumas características tradicionalmente citadas como relacionadas à aquisição da tuberculose também foram investigadas. A aglomeração de pessoas foi investigada através da investigação do número de adultos no domicílio. Em média existiam  $3,1 \pm 1,89$  adultos em cada domicílio dos pacientes co-infectados TB-HIV e um número similar também foi encontrado nos domicílios dos casos controles, portanto, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p=0,3002$ ).

Tabela 6: Descrição do comportamento dos grupos em relação ao tabagismo e etilismo.

	TB + HIV n (%)		HIV n (%)		RR	Odds Ratio	p-valor
<b>Tabagismo</b>							
Sim	82	41,21	36	40,45	1,0097	1,0318	1,0000
Não	117	58,79	53	59,55			
Total	199	100	89	100			
SI	7		14				
<b>Etilismo</b>							
Sim	69	34,50	51	57,95	0,7374	0,3821	0,0003
Não	131	65,50	37	42,05			
Total	200	100	88	100			
SI	8		15				

RR – Risco Relativo; SI: sem informações.

A história de contato prévio com paciente portador de tuberculose foi mais freqüente no grupo dos pacientes co-infectados TB-HIV (13,60% e  $p=0,0481$ ) do que no grupo controle (4,17%). O risco relativo para a infecção com o *M. tuberculosis* foi 39,31% maior no pacientes contactantes de TB em relação aos pacientes sem contato prévio com TB (Tabela 7). De modo similar foi observado um percentual maior de pacientes com história de tratamento prévio para tuberculose entre os pacientes co-infectados TB-HIV (9,09% e  $p=0,0517$ ) do que nos pacientes do grupo controle (2,91%) (Tabela 7). Quanto ao uso de quimioprofilaxia prévia para tuberculose com isoniazida, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ( $p=1,0000$ ) (Tabela 7).

Tabela 7: Análise estatística da história de contactante domiciliar com TB, tratamento prévio e uso de quimioprofilaxia para TB entre os pacientes co-infectados e os controles.

	TB + HIV n (%)		HIV n (%)		RR	Odds Ratio	p-valor
<b>Contactante com TB</b>							
Sim	17	13,60	3	4,17	1,3931	3,6204	0,0481
Não	108	86,40	69	95,83			
Total	125	100	72	100			
SI	83		31				
<b>Tratamento Prévio TB</b>							
Sim	16	9,09	3	2,91	1,3684	3,3333	0,0517
Não	160	90,91	100	97,09			
Total	176	100	103	100			
SI	32		-				
<b>Profilaxia para TB</b>							
Sim	10	6,25	7	6,80	1,0366	1,0958	1,0000
Não	150	93,75	96	93,20			
Total	160	100	103	100			
SI	48		-				

RR - Risco Relativo; SI: sem informações.

A história da infecção pelo HIV e os estadiamentos clínico e imunológico foram analisados em virtude da importância desses dados na determinação da aquisição, desenvolvimento e evolução da tuberculose. A média do tempo entre o diagnóstico da infecção pelo HIV e o diagnóstico da TB foi de 34,8 meses nos pacientes co-infectados. No grupo controle, a média do tempo entre o diagnóstico da infecção pelo HIV e a data de realização do estudo foi de 31,1 meses. Portanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,8346$ ). Uma melhor análise destes dados pode ser vista na figura 8 e na tabela 8.

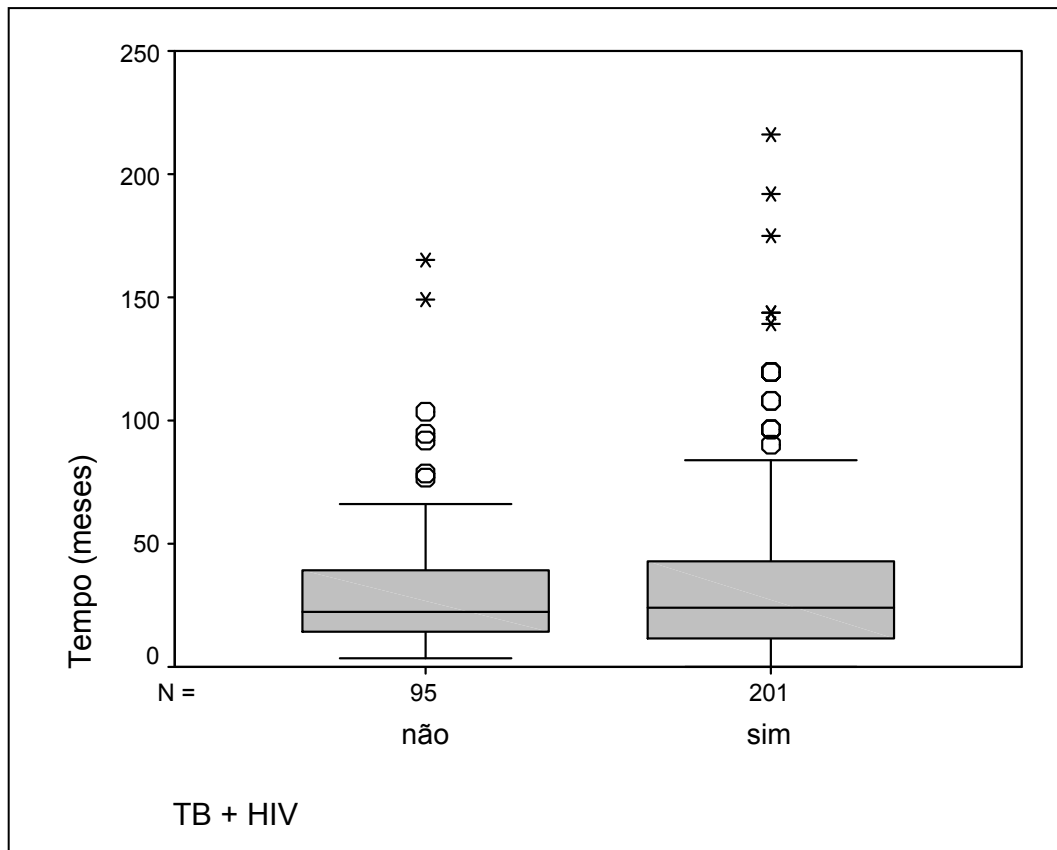


Figura 8: Tempo de diagnóstico do HIV. Legenda: o símbolo ○ representa valores extremos e o símbolo \* representa *outliers*.

Tabela 8: Análise do tempo de diagnóstico do HIV entre os pacientes co-infectados e os controles.

Tempo de diagnóstico do HIV*	n	Média (meses)	Desvio-padrão	Mann-Whitney	p-valor
TB + HIV	201	34,8	36,03	9404	0,8346
HIV	95	31,1	28,15		

\* Casos: tempo entre o diagnóstico de infecção pelo HIV até e o diagnóstico de micobacteriose. \*  
Controles: tempo entre o diagnóstico de infecção pelo HIV e a data do estudo.

Uma vez que a tuberculose pulmonar e/ou extrapulmonar são doenças definidoras de aids segundo a classificação do CDC (1992), todos os pacientes dos grupos dos co-infectados TB-HIV apresentam classificação clínica C. Assim, a diferença entre os percentuais de pacientes com

classificação clínica C entre os grupos estudados é significativa ( $p=0,0000$ ). A tabela 9 descreve a distribuição da classificação clínica dos pacientes.

Tabela 9: Distribuição da classificação clínica dos pacientes estudados entre os pacientes co-infectados e os controles:

<b>Classificação</b>						
<b>Clínica</b>	<b>TB + HIV n (%)</b>		<b>HIV n (%)</b>		<b>Total</b>	<b>p-valor</b>
A	--	--	58	56,31%	58	0,0000
B	--	--	23	22,33%	23	
C	208	100%	22	21,36%	230	
Total	208	100%	103	100%	311	

Em relação à classificação imunológica realizada em 184 pacientes co-infectados com TB-HIV, 72,28% deles apresentavam classificação 3, 26,09% classificação 2 e, somente 1,63% tinham classificação 1. Houve um percentual maior de pacientes com classificação 3 neste grupo do que no grupo controle e esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,0000$ ) (Tabela 10).

Tabela 10: Distribuição da classificação imunológica dos pacientes estudados entre os pacientes co-infectados e os controles.

<b>Classificação</b>						
<b>Imunológica*</b>	<b>TB + HIV n (%)</b>		<b>HIV n (%)</b>		<b>Total</b>	<b>p-valor</b>
1 (>500 cels/mm <sup>3</sup> )	3	1,63	16	15,69	19	
2 (200-500 cels/mm <sup>3</sup> )	48	26,09	38	37,25	86	
3 (<200 cels/mm <sup>3</sup> )	133	72,28	48	47,06	181	0,0000
Total	184	100	102	100	286	
SI	24		1			

Legenda: \* CDC (1992); SI: sem informações.

Em relação à dosagem de linfócitos T CD4+ no momento do diagnóstico da TB, os pacientes co-infectados TB-HIV apresentavam maior grau de imunossupressão do que o grupo controle ( $p=0,0000$ ). A média de linfócitos T CD4+ foi de 168  $\text{cels}/\text{mm}^3$  no primeiro grupo contra 377  $\text{cels}/\text{mm}^3$  do grupo controle (Figura 9)

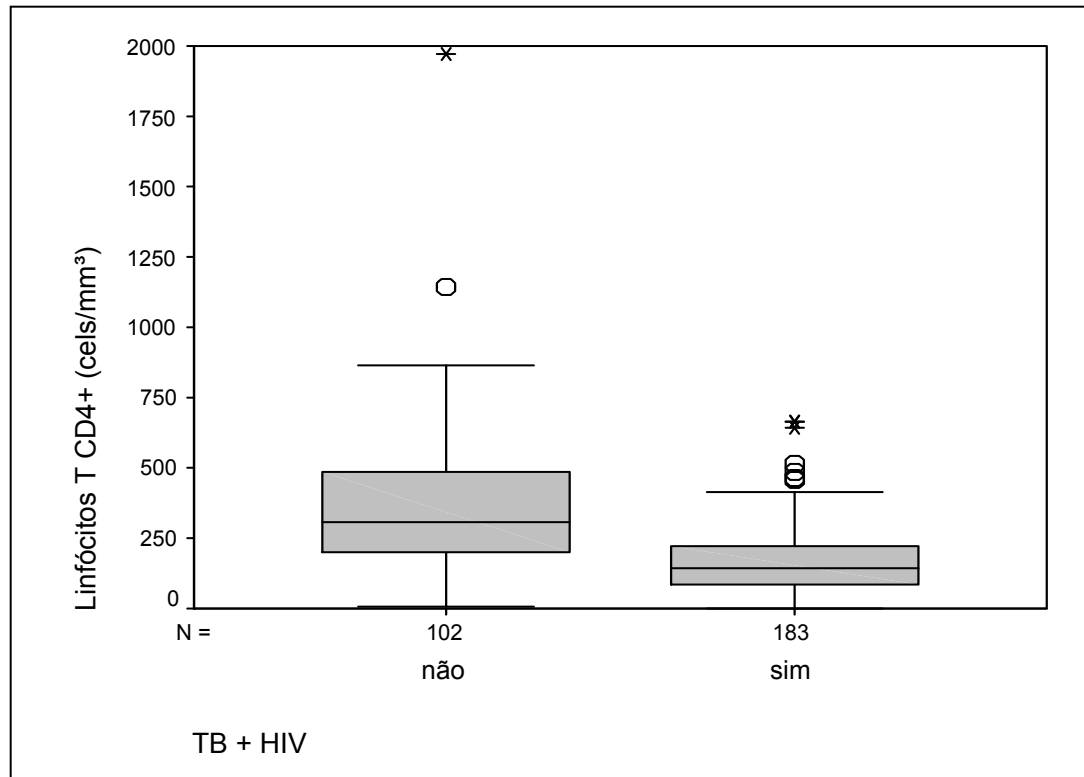


Figura 9: Gráfico de contagem de linfócitos T CD4+ ( $\text{cels}/\text{mm}^3$ ). Legenda: o símbolo  $\circ$  representa valores extremos e o símbolo \* representa *outliers*.

Quanto à carga viral plasmática, os pacientes com diagnóstico de co-infecção TB-HIV tiveram maior valor de logaritmo natural de carga viral ( $\log 4,36$ ) em relação ao grupo controle ( $\log 2,89$ ;  $p=0,0013$ ;  $t\text{-Student} = 8,893$ ; Figura 10).

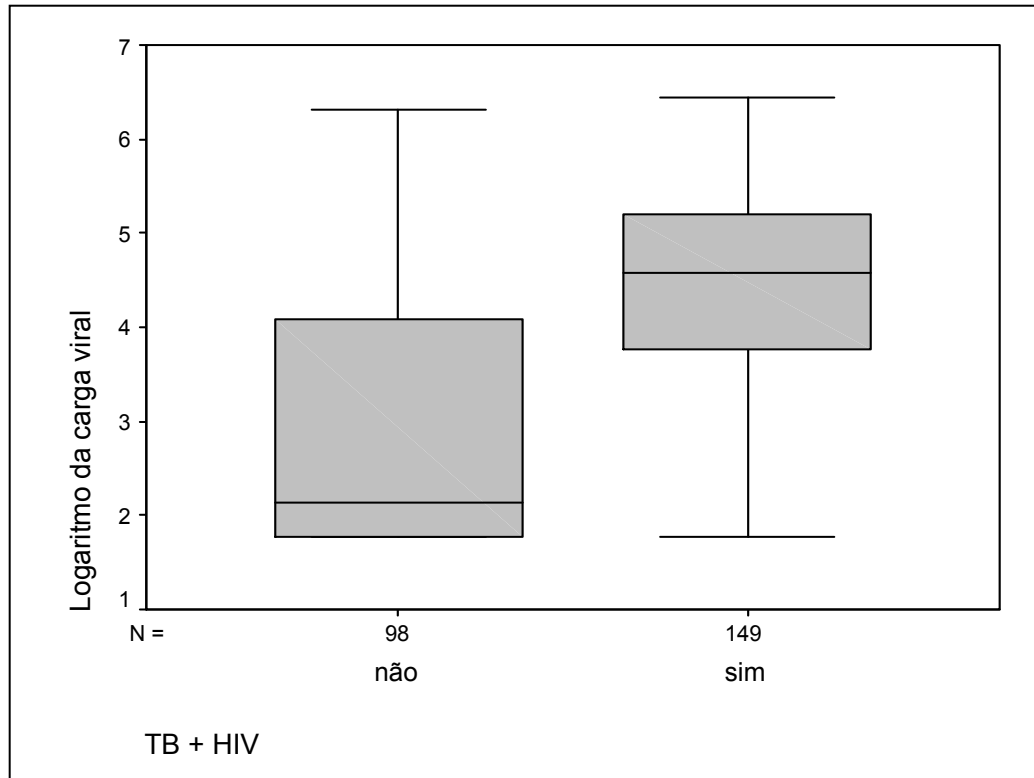


Figura 10: Gráfico de análise do logaritmo da carga viral.

Em relação ao uso de terapia antiretroviral (TARV), 78,16% dos pacientes com tuberculose estavam em uso de HAART. Ademais, foi evidenciado um percentual maior de pacientes que realizou tratamento antiretroviral no grupo dos pacientes co-infectados TB-HIV ( $p=0,0000$ ), sendo o risco relativo de 49,35% maior nesses pacientes em relação aos que não realizaram tratamento (tabela 11).

Tabela 11: Análise do uso de HAART entre os pacientes co-infectados e os controles.

HAART	TB + HIV n (%)	HIV n (%)	RR	Odds Ratio	p-valor
Sim	161 78,16	57 55,34	1,4935	2,8873	0,0000
Não	45 21,84	46 44,66			
Total	206 100	103 100			
SI	2	-			

RR - Risco Relativo; SI: sem informações.

O diagnóstico dos casos de co-infecção TB-HIV foi realizado em bases clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. A tabela 12 resume os resultados dos principais exames complementares realizados.

Tabela 12: Distribuição dos casos de TB de acordo com ao RX de tórax, PPD e análise microbiológica (cultura em Löwestein-Jensen e pesquisa de BAAR em lâmina) nos pacientes co-infectados com TB-HIV.

	<b>Total</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>RX tórax</b>	40		
Sugestivo		23	57,50
Não sugestivo		7	17,50
Não realizado		10	25,00
<b>PPD</b>	208		
Reator		21	10,10
Não-reator		69	33,17
Não realizado		118	56,73
<b>Análise Microbiológica</b>	122		
Cultura positiva			
Pesquisa BAAR positiva		36	29,51
Pesquisa BAAR negativa		26	21,31
Cultura negativa			
Pesquisa BAAR positiva		13	10,65
Pesquisa BAAR negativa		47	38,52

Legenda: BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente

Em relação ao PPD, exame de bastante utilidade no diagnóstico da TB, todavia não confirmatório, apenas 90 pacientes (43,26%), de um total de 208, realizaram o teste. Desses 90, 76,66% apresentaram resultado não-reator, enquanto 23,33% foram reatores. O PPD não foi realizado em 56,73% dos pacientes. Não foi investigado o teste do PPD no grupo controle.

Em relação ao raio-X de tórax, 57,5% apresentavam alterações radiológicas consideradas sugestivas de TB, 17,5% não tinham alterações radiológicas ou estas não eram sugestivas de TB e 25% dos pacientes não realizaram o referido exame diagnóstico.

O diagnóstico confirmatório da TB, em pacientes sintomáticos, é realizado pelo isolamento do bacilo tanto em meio de cultura específico como pela visualização direta em esfregaço de amostra clínica em lâmina corada pelo Ziehl-Neelsen. Dos 208 pacientes portadores da co-infecção TB-HIV, somente 122 (58,65%) foram submetidos à pesquisa direta de BAAR e cultura em LJ. Desses 122 pacientes com pesquisa direta e cultura de BAAR, somente 36 tinham pesquisa e cultura de BAAR positivas, enquanto 26 tinham cultura positiva e pesquisa negativa, 13 tinham pesquisa positiva e cultura negativa e 47 tinham pesquisa e cultura negativas. Além disso, 86 pacientes (41,34%) não realizaram ou a pesquisa ou a cultura, ou ambos. Desses 86 pacientes, 15 realizaram somente cultura, com 11 positivas e 4 negativas (Tabela 12).

Quanto à apresentação clínica, 45,68% dos pacientes tiveram TB pulmonar, 28,40% apresentaram TB extrapulmonar e 25,92% apresentaram a forma disseminada.

Ao tentar correlacionar a contagem de linfócitos CD4+ à reação ao PPD em uma população de 82 pacientes, notou-se que a contagem de linfócitos CD4+ não possui diferença estatisticamente significativa entre PPD reator (média  $232 \pm 184,6$  cels/mm<sup>3</sup>) e não-reator (média  $165 \pm 96,4$  cels/mm<sup>3</sup>) ( $p=0,1256$ ;  $t\text{-Student}=1,587$ ), apesar de haver uma tendência da contagem de CD4+ ser menor nos pacientes não-reatores conforme mostrado na figura 11.

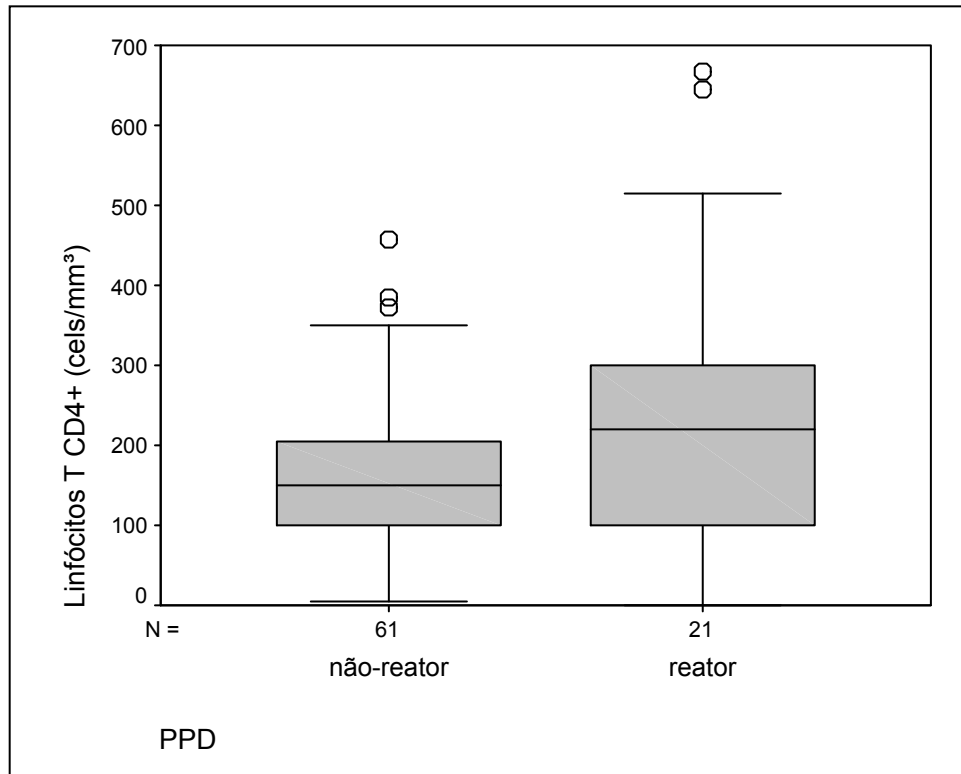


Figura 11: Relação entre a contagem de linfócitos T CD4+ (cels/mm<sup>3</sup>) e a reação ao PPD.

Da mesma forma, em uma população de 43 pacientes, não houve relação entre a reação ao PPD e a sítio de apresentação clínica da tuberculose ( $p=0,6808$ ) Tabela 13. Também não houve diferenças estatisticamente significantes quando se comparou a forma clínica da tuberculose com o tempo de infecção pelo HIV ( $p=0,2458$ ), contagem de linfócitos T CD4+ ( $p=0,5344$ ), carga viral plasmática ( $p=0,8268$ ) e o uso de terapia antiretroviral ( $p=0,8074$ ) (Tabela 14).

Tabela 13: Relação entre o PPD e a forma clínica da tuberculose.

Sítio	PPD						Total
	Não-reator n (%)		Reator n (%)		NR n (%)		
Pulmonar	9	24,32	3	8,11	25	67,57	37
Extrapulmonar	7	30,43	4	17,39	12	52,17	23
Disseminada	7	33,33	3	14,29	11	52,38	21
Total	23	28,40	10	12,35	48	59,26	81

NR: não realizado

Tabela 14: Análise do tempo de infecção pelo HIV, contagem de linfócitos CD4+ (cels/mm<sup>3</sup>) e da carga viral plasmática (log) em relação à forma clínica da tuberculose.

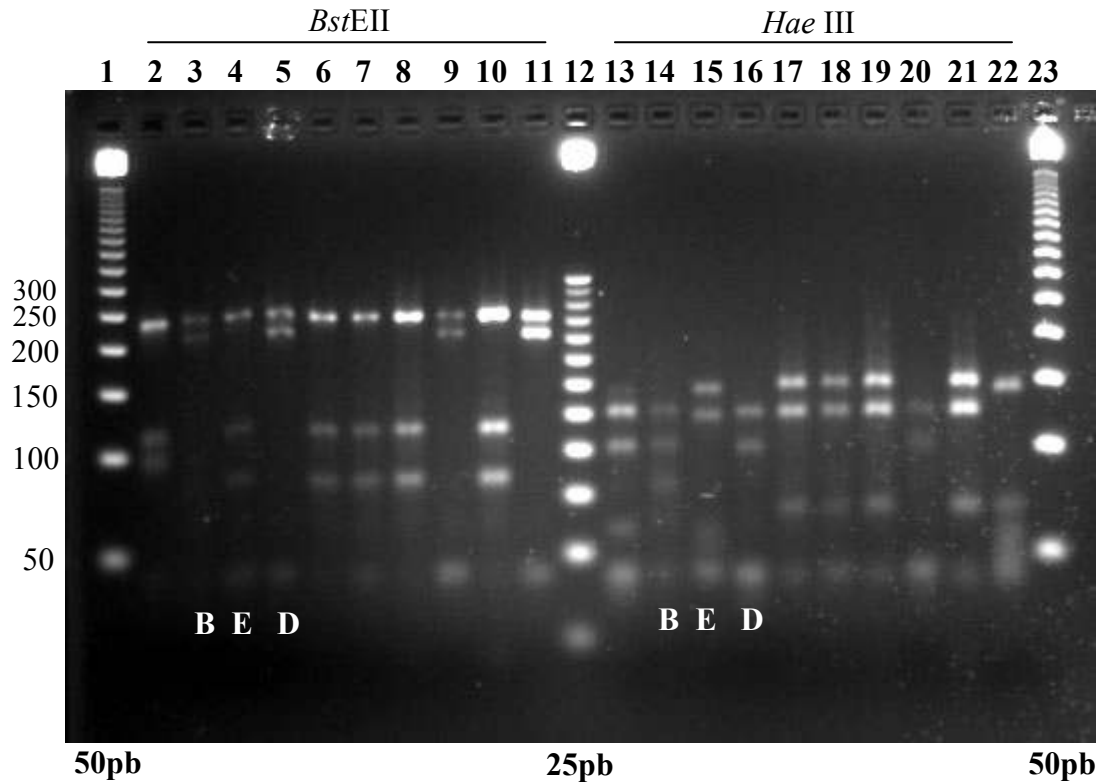
	<b>Forma Clínica</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Estat. F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tempo HIV</b>	Pulmonar	36	43,89	43,32	1,429	0,2458
	Extrapulmonar	23	34,96	36,75		
	Disseminada	21	26,95	22,7		
<b>CD4+</b>	Pulmonar	32	165,41	148,04	0,633	0,5344
	Extrapulmonar	19	183,16	144,73		
	Disseminada	19	134,05	105,24		
<b>Log Carga viral</b>	Pulmonar	27	4,54	1,172	0,191	0,8268
	Extrapulmonar	15	4,41	1,256		
	Disseminada	17	4,32	1,206		

Legenda: Estat. F: estatística F

Dentre os 723 pacientes que tinham cultura positiva para BAAR, foi realizada identificação de 39 amostras, 34 (81,18%) apresentavam características morfológicas e de crescimento que permitiram caracterizá-las como *M. tuberculosis* e 5 (12,82%) amostras foram caracterizadas como não características de *M. tuberculosis*. A identificação ao nível de espécie dessas 5 amostras é apresentada na tabela 15.

Dentre as 5 amostras classificadas como não características de *M. tuberculosis*, 4 foram submetidas à identificação molecular através da técnica PRA. Devido ao pequeno número de isolados, não foi possível realizar qualquer análise estatística, sendo suas características apresentadas na tabela 15. A razão para a não identificação de uma das amostras (paciente C) foi porque o isolado não apresentou crescimento após ser reinoculado do tubo primário para um segundo contendo meio de cultura específico, perdendo-se desta forma a cultura. A identificação do paciente A foi realizada no Instituto Adolfo Lutz, pois a amostra foi enviada pelo LACEN para identificação e não foi armazenada. Desta forma, não existem os padrões do PRA para este paciente. A figura 13 exibe os padrões do PRA das cepas submetidas à identificação ao nível de espécie.

Figura 12: Foto de eletroforese em gel de agarose 4,5% mostrando os padrões do PRA das cepas submetidas à identificação ao nível de espécie.



Eletroforese em gel de agarose 4,5% (MS8 Agarose – BIOAMÉRICA) de produtos de digestão enzimática do gene *hsp65* (441pb) de micobactérias com as enzimas *BstEII* e *Hae III*. Os poços 3 e 14 representam as amostras do paciente B, *M. kansasii*. Os poços 4 e 15 representam as amostras do paciente E, *M. fortuitum*. Os poços 5 e 16 representam as amostras do paciente D, *M. goodnae*. Os poços 9 e 20 representam a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv. Os poços 1 e 23 contêm 6,0µL do marcador de peso molecular de 50pb (PROMEGA). O poço 12 contém 6,0µL do marcador de peso molecular de 25pb (PROMEGA). Os demais poços contêm outras amostras não incluídas neste estudo.

Tabela 15: Características epidemiológicas dos pacientes com micobacteriose atípica:

Características	Pacientes				
	A	B	C	D	E
<b>Espécie identificada</b>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	--	<i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i>
<b>Tempo infecção HIV (meses)</b>	6	120	96	2	39
<b>Classificação Imunológica</b>	3	3	3	3	3
<b>Linf. T CD4+ (cels/mm<sup>3</sup>)</b>	45	138	55	7	30
<b>HAART</b>	Sim	Sim	Não	Não	Não
<b>Amostra clínica</b>	LBA	Escarro	Líquor	Medula óssea	Escarro
<b>Forma clínica</b>	Pulmonar	Pulmonar	Meníngea	Disseminada	Pulmonar
<b>Tratamento</b>	I	I - R	Não realizou		I
<b>Evolução</b>	Alta por cura	Em tratamento	Óbito	Óbito	Em tratamento

Legenda: Tratamento: Esquema I: RHZ por 2 meses + RH por 4 meses; esquema I-R = RHZE por 2 meses + RHE por 4 meses. LBA: lavado bronco-alveolar.

O teste de sensibilidade às drogas foi realizado nos 34 isolados de *M. tuberculosis*. Trinta isolados (88,23%) apresentaram sensibilidade a todas as drogas, 2 (5,89%) eram resistentes a uma única droga (isoniazida) e outras 2 (5,89%) apresentavam resistência a duas drogas sendo estas a isoniazida e a rifampicina. Nenhum isolado com resistência a mais de duas drogas foi documentado. Em virtude do pequeno número de amostras de pacientes com resistência às drogas, foram detalhadas algumas características epidemiológicas destes pacientes (Tabela 16).

Tabela 16: Características epidemiológicas dos quatro pacientes co-infectados TB/HIV com isolados clínicos resistentes a drogas.

<b>Características</b>	<b>Isolados (n=4)</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Resistência</b>	H	H	H e R	H e R
<b>Tempo infecção HIV</b>	Zero	57 meses	84 meses	57 meses
<b>Contactante TB</b>	Não	Não	Sim	Não
<b>Tratamento prévio</b>	Não	Não	Sim	Não
<b>Adesão irregular</b>	Não	Não	Sim	Não
<b>Forma clínica</b>	Disseminada	Pleural	Pulmonar	Pulmonar
<b>Tratamento</b>	I → I-R	I	I → I-R → III	I → III
<b>Evolução</b>	Alta por cura	Alta por cura	Em tratamento	Em tratamento

H – isoniazida, R – rifampicina, → - indica mudança de esquema de tratamento.

## 5. Discussão

A incidência da tuberculose tem aumentado mundialmente e esse fato está fortemente relacionado à infecção pelo HIV (SILVEIRA *et al.*, 2006; BLOOM; MURRAY, 1992). Além disso, a diminuição de recursos para programas anti-tuberculose, a má administração da infraestrutura assistencial e o pequeno investimento científico têm contribuído para a atual situação (LIMA *et al.*, 1997). Aproximadamente treze milhões de pessoas estão agora co-infectadas com o *M. tuberculosis* e o HIV no mundo todo (WHO, 2003) e o Brasil pertence a um grupo de 22 países que são responsáveis por 80% de todos os casos de TB no mundo, ocupando a décima sexta posição em relação ao número total de casos (WHO, 2006).

A infecção pelo HIV e a TB resistente a drogas constituem dois importantes fatores que têm dificultado o sucesso das ações dos programas de controle da TB. Assim, a compreensão da interação entre as duas patologias, englobando suas interfaces clínicas, epidemiológicas e terapêuticas, é determinante para o desenvolvimento de medidas de controle adequadas à co-infecção.

As informações científicas sobre a co-infecção TB-HIV do ponto de vista epidemiológico e de análise da multiresistência são deficientes em nosso país, principalmente na região Nordeste. Esse estudo, portanto, busca fornecer respostas para auxiliar no estabelecimento de condutas diagnósticas, profiláticas e terapêuticas adequadas à realidade local.

É importante enfatizar que apesar dos centros de referência habitualmente receberem os casos mais complexos e severos, com mais dificuldades diagnósticas, isto não foi particularmente verdadeiro no hospital no qual foi realizado este estudo. Além de ser um hospital de referência para casos complexos, o HSJ, no momento da realização do estudo, também realizava o acompanhamento da maioria dos pacientes soropositivos da cidade de Fortaleza e do estado do Ceará. Por conseguinte, os dados encontrados neste estudo representam o perfil epidemiológico do Estado.

Algumas dificuldades encontradas na realização da pesquisa foram a ausência de algumas informações nos prontuários médicos assim como a não realização de alguns exames complementares. Em virtude do desenho da pesquisa, a busca da prevalência da TB nos pacientes infectados pelo HIV não constituiu um objetivo deste estudo, entretanto, esse é um dado também importante e campo para futuras pesquisas.

Dentre os pacientes do presente estudo, cinco pacientes apresentaram diagnóstico de micobacteriose atípica. Esse pequeno número não foi suficiente para determinar mudanças

estatisticamente significantes nas análises realizadas. Assim, ao analisar os fatores de risco, preferiu-se referi-los como fatores relacionados ao risco de adquirir TB e não de adquirir micobacteriose, portanto, quando for citado fator de risco, ele refere-se ao risco para adquirir a TB.

### **5.1 Dados epidemiológicos populacionais:**

Foi observada uma predominância de casos em pacientes adultos entre 25 e 49 anos, com média de idade de 40 anos e com maior número de casos entre 35 a 39 anos, evidenciando uma tendência para notificação da co-infecção em pacientes adultos com maior idade do que os verificados na literatura (SILVEIRA *et al.*, 2006; EYOB *et al.*, 2004; HENN; NAGEL; DAL PIZZOL, 1999; KERR-PONTES; OLIVEIRA; FREIRE, 1997; CASTILLA *et al.*, 1997). Kerr-Pontes, Oliveira e Freire (1997), em estudo realizado no estado do Ceará, observaram uma predominância de casos em adultos jovens, com faixa etária de maior observação entre 30 e 40 anos. Observação semelhante também foi realizada por Henn, Nagel e Dal Pazzol (1999) e Eyob *et al.* (2004) que, ao descreverem as características demográficas de populações co-infectadas TB-HIV, relataram a média de idade de 33,4 e 30 anos, respectivamente. Além disso, em um estudo realizado na Espanha para investigação das diferenças epidemiológicas de entre TB pulmonar e extrapulmonar em pacientes com aids, a presença de TB no momento do diagnóstico de aids estava associado com idade menor que 30 anos (CASTILLA *et al.*, 1997). Essa diferença, entretanto, pode ser justificada pela idade mais elevada de notificação de aids nos Brasil, cuja média de idade no momento da notificação, nos anos de 2002 a 2005, foi de 35,35 anos (DATASUS, 2006).

Examinar a dimensão do sexo na tuberculose é mais do que descobrir qual sexo tem maior taxa de prevalência, ou uma maior taxa de mortalidade. Isso também inclui analisar questões como diferenças no risco de exposição à infecção, no comportamento de busca da saúde e na resposta dos sistemas de saúde, conseqüências econômicas e o estigma associado com ser conhecido como um paciente com tuberculose.

Em quase todos os países, as taxas de incidência de tuberculose são maiores em homens em todas as idades, exceto em crianças, quando elas são maiores no sexo feminino. Segundo Holmes, Hausler e Nunn (1998), a tuberculose sem co-infecção pelo HIV predomina nos homens na razão de 2:1 nos casos notificados mundialmente. Todavia, há relatos de

predomínio de mulheres em relação à taxa de progressão de infecção para doença, na incidência de doença clínica e na mortalidade devido à TB (HOLMES; HAUSLER; NUNN, 1998).

Lienhardt *et al.* (2005), em um estudo de caso-controle para a investigação de fatores de risco para tuberculose na África, observou a associação da TB com o sexo masculino, relatando-o como fator de risco. Silveira *et al.* (2006) e Corbett *et al.* (2007), através de estudos epidemiológicos realizados em populações infectadas pelo HIV, obtiveram resultados semelhantes, sendo precisos no relato do sexo masculino como fator de risco para TB nesta população. Do mesmo modo, no presente estudo, houve a predominância da TB no sexo masculino em pacientes co-infectados com HIV, tendo a população masculina um risco relativo 43% maior de desenvolver TB do que a mesma população do sexo feminino.

Algumas características relativas ao comportamento dos homens, principalmente após a adolescência, podem contribuir para uma maior infecção dos homens. Os homens estão mais amplamente expostos a outras pessoas com TB como consequência de sua maior interação social fora do domicílio. Além disso, os homens fazem mais migrações e são mais submetidos ao encarceramento em presídios (WHO, 2004a).

É difícil explicar se o número elevado de casos na população masculina se deve a uma deficiência no diagnóstico e na notificação dos casos na população feminina por dificuldades sociais de acesso aos serviços públicos de saúde ou se há diferenças genéticas entre os sexos (DIWAN; THORSON, 1999). Bellamy *et al.* (2000), em um estudo em busca de regiões no genoma humano que contenham genes associados à susceptibilidade à TB, sugerem haver uma relação entre regiões do cromossomo X e TB.

Segundo Diwan e Thorson (1999), uma combinação de fatores sociais e biológicos é responsável por essas diferenças, no entanto, o conhecimento e as pesquisas relacionadas a este assunto são insuficientes para esclarecer o predomínio dos homens.

Existem poucas informações sobre a importância do estado civil na determinação do risco de desenvolvimento da TB. Observou-se neste estudo uma predominância de solteiros na população estudada ( $p=0,0607$ ). Ademais, os pacientes solteiros tiveram um risco relativo de adquirir TB 19,25% maior que as demais categorias. Lienhardt *et al.* (2005), em um estudo realizado em três países africanos, relatou ser o estado civil solteiro como fator de risco independente para TB. Acredita-se que esse risco possa ser reflexo das características demográficas e sócio-econômicas desta população. Pessoas solteiras usualmente são mais jovens que os casados e têm estilos de vida diferentes, especialmente homens, que frequentemente fazem

migrações em busca de empregos e têm maior oportunidade de contato com inúmeras pessoas, aumentando a possibilidade de exposição ao bacilo.

A procedência dos pacientes reflete as características epidemiológicas das infecções nos locais de origem dos pacientes. Neste estudo, investigou-se a procedência dos pacientes separando-a, para simplificação da análise, em duas categorias: origem do interior do estado ou da capital. Apesar da maior parte dos pacientes serem de Fortaleza (60,40%), a diferença não foi significativa ( $p=0,3168$ ). Uma vez que a TB está difusamente distribuída no estado (SESA, 2006), essa informação provavelmente reflete a expansão da pandemia do HIV para interior, documentada através do número crescente de municípios do estado com notificação de casos do HIV (SESA, 2006b). Os poucos trabalhos epidemiológicos realizados a nível regional nestas populações não analisaram esta informação e, portanto, nenhuma comparação para comprovação desta hipótese pode ser realizada.

A TB tem sido usualmente associada com pobreza. Em países industrializados, a TB foi classicamente associada com péssimas condições de vida (DRUCKER *et al.*, 1994; SPENCE *et al.*, 1993). O *status* sócio-econômico é difícil de mensurar e não existem critérios uniformes para sua investigação. Entretanto, o nível de escolaridade, tradicionalmente, tem sido usado como um indicador sócio-econômico quando não se dispõe de outros indicadores mais precisos. Assim, no presente estudo, foram coletadas informações sobre a renda familiar e nível de escolaridade.

Os pacientes com nível de escolaridade baixo tiveram duas vezes mais chance de adquirir TB que os demais pacientes. Além disso, o nível de escolaridade foi significativamente mais baixo nos pacientes co-infectados TB-HIV ( $p<0,0001$ ).

Vários estudos são enfáticos em demonstrar que os pacientes co-infectados com TB e HIV têm em sua maioria nível de escolaridade baixo (menor que 8 anos de estudo) (SILVEIRA *et al.*, 2006; LIENHARDT *et al.* 2005; MURRAY *et al.*, 1999; KERR-PONTES; OLIVEIRA; FREIRE, 1997). Todavia, eles são inconclusivos quanto à demonstração da relação de risco do nível de escolaridade e a TB. Enquanto Kerr-Pontes, Oliveira e Freire (1997) relataram uma tendência crescente da presença da TB entre os casos de aids conforme decrescia o nível de escolaridade dos casos, Silveira *et al.* (2006) não conseguiu significativamente determiná-lo como fator de risco para TB.

Como reflexo ou conseqüência da escolaridade baixa, a maioria dos pacientes co-infectados vive em situação de pobreza, com renda igual ou inferior a um salário mínimo. Esse

dado é também semelhante aos apresentados nos casos de infecção pelo HIV e representa somente a situação de renda da população infectada pelo HIV (Kerr-Pontes 1992).

O tabagismo resulta em mudanças histológicas no trato respiratório inferior, incluindo inflamação peribrônquica, fibrose, espessamento da íntima vascular e destruição alveolar. Isto leva a alterações na função epitelial com redução da atividade ciliar, diminuição do *clearance* das substâncias inaladas e anormalidade na permeabilidade vascular e epitelial (AUBRY; WRIGHT; MYERS, 2000). Estudos de caso-controle realizados na Espanha e Índia reportaram uma associação de dose-dependência entre o tabagismo e a TB pulmonar (KOLAPPAN; GOPI, 2002; ALCAIDE *et al.*, 1996). Similarmente, em estudos realizados na África, Hill *et al.* (2006) e Lienhardt *et al.* (2005) postularam o tabagismo como um fator de risco independente para TB com um claro efeito de dose-resposta relacionado à duração do tabagismo.

Na literatura, informações em relação ao tabagismo na população co-infectada TB-HIV são escassos. Neste trabalho o tabagismo não pode ser relacionado como fator de risco para TB, tampouco predominou nos pacientes co-infectados em relação ao grupo controle. Em trabalho semelhante realizado por Silveira *et al.* (2006) com pacientes infectados pelo HIV acompanhados em centro de referência no Rio Grande do Sul também não conseguiu correlacionar o tabagismo com o desenvolvimento da TB.

Poucos trabalhos foram conduzidos para investigar os efeitos do alcoolismo na TB e seus resultados foram inconclusivos: enquanto um encontrou uma relação de risco entre a ingestão de álcool e TB (LIENHARDT *et al.*, 2005), outros falharam em demonstrar essa associação (VAN DER WERF *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2006). Além disso, aumentando ainda mais tal inconclusão, verificou-se, no atual estudo, uma maior presença de etilismo no grupo controle do que no grupo com TB ( $p=0,0003$ ).

Alguns vieses presentes neste estudo podem ter influenciado os resultados em relação ao tabagismo e alcoolismo. Informações importantes não foram investigadas como a quantificação precisa do nível de exposição a tais hábitos, a relação temporal entre uso tais drogas e o diagnóstico da TB além da própria doença poder afetar a exposição.

## **5.2 Fatores diretamente relacionados à TB**

A aglomeração de adultos reflete no aumento da probabilidade de entrar em contato com pessoas expelindo o bacilo em ambientes lotados. Classicamente tem sido relatada a aglomeração de pessoas em um mesmo ambiente como fator relacionado à TB (HILL *et al.*,

2006; LIENHARDT *et al.*, 2005). Contrariando esse fato, na presente pesquisa não foi evidenciada diferença em relação ao número de adultos no domicílio entre os casos e os controles ( $p=0,3002$ ). Provavelmente tal diferença deva-se ao fato das investigações citadas terem sido realizadas na África, onde diferentes características sociais e comportamentais como poligamia favorecem a aglomeração no domicílio. Além disso, tais estudos não contemplam especificamente a população de pacientes co-infectados pelo HIV e, como discutido previamente, nesta população predominam os adultos e solteiros, que, por suas características comportamentais, tendem ter residência própria, não permanecendo na casa paterna.

De acordo com Fitzgerald e Haas (2005), os mais importantes determinantes para a infecção pelo *M. tuberculosis* em pessoas com teste tuberculínico negativo são o contato com pessoas com TB e a infectividade da fonte. Nesse estudo, fortalecendo as informações da literatura, a história de contato prévio com paciente portador de tuberculose foi mais freqüente no grupo dos pacientes co-infectados TB-HIV (13,60% -  $p=0,0481$ ) sendo o risco relativo para a infecção pelo bacilo 39,31% maior no pacientes contactantes de TB em relação aos pacientes sem contato prévio com TB. Outros autores também observaram uma consistente relação de risco entre contato anterior com TB no domicílio e o risco de desenvolver TB, e este efeito aumentava com o número contactantes no passado. Além disso, existem algumas evidências que esse risco é maior quando maior for a proximidade familiar com o caso de TB do domicílio (CORBETT *et al.*, 2007; HILL *et al.*, 2006; LIENHARDT *et al.*, 2005).

Este agrupamento de TB na família pode refletir não somente a transmissão dentro do ambiente do lar, mas também uma contribuição genética para a susceptibilidade à TB. Este aspecto tem sido investigado e os resultados, por exemplo, têm mostrado que variantes de receptores de vitamina D, assim como deficiência de vitamina D, podem ter um impacto na susceptibilidade à TB (BELLAMY, 2005; BORNMAN *et al.*, 2004). Ademais, vários tipos de receptores de antígenos de leucócitos humanos (*Human Leucocyte Antigen*, HLA) de classe I assim como o *HLA-DR2* têm sido associado à tuberculose em várias populações (BALAMURUGAN; SHARMA; MEHRA, 2004; GOLDFELD *et al.*, 1998; BRAHMAJOTHI *et al.*, 1991; SINGH *et al.* 1983).

O potencial de transmissão do *M. tuberculosis* a partir de pacientes co-infectados TB-HIV para os contatos domiciliares foi investigado através de estudos epidemiológicos e moleculares usando DNA *fingerprints*. Ambos postularam que os pacientes co-infectados TB-HIV são menos prováveis de infectar seus contatos domiciliares que os pacientes soronegativos

para HIV (CRAMPIN *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2001, GUWATUDDE *et al.*, 2001; ESPINAL *et al.*, 2000). Os fatores associados com esse menor risco de transmissão da TB por pacientes HIV positivos não estão completamente entendidos, entretanto, uma reduzida eliminação bacilar relacionada ao tempo de duração da tosse e à menor formação de cavitações pulmonares (DALEY, 1995; CHAISSON *et al.*, 1987) podem explicar tal fato.

Segundo Ho (1996), a infecção pelo HIV aumenta os riscos de desenvolvimento de TB ativa pela reativação de uma infecção latente ou pela rápida progressão de uma infecção recém-adquirida. Neste estudo, a maioria dos pacientes relatou que não tinham tido contato prévio com pessoas com TB (86,40%) e que não haviam realizado tratamento prévio (90,91%). Apesar disso, a observação de tratamento prévio foi maior entre os pacientes com TB ( $p=0,0517$ ) que no grupo sem TB, sendo o risco de adquirir TB 36,84% maior naqueles que realizaram tratamento prévio. Similarmente, Corbett *et al.* (2007) em um estudo para a investigação da epidemiologia da TB em uma população com alta prevalência de infecção pelo HIV, descreveram o tratamento prévio para TB como fator relacionado a um aumento nas taxas de TB com cultura positiva.

Uma análise de todos esses dados sugere que os indivíduos neste estudo tenham apresentado doença ativa a partir progressão de uma infecção recente ou de reativação de uma infecção latente. Para diferenciar a forma de aquisição da infecção é necessário que sejam realizados estudos com marcadores moleculares, tais como MIRU-VNTR, *spoligotyping* e IS6110-RFLP.

O diagnóstico de uma infecção latente pelo *M. tuberculosis* reside primariamente na realização do teste tuberculínico, um teste intradérmico que utiliza derivados protéicos purificados (*purified protein derivative*, PPD). Nos pacientes infectados pelo HIV, uma resposta cutânea ao PPD de 5 ou mais milímetros representa uma evidência de infecção latente pelo *M. tuberculosis*. Todas as pessoas com evidência de infecção latente devem ser avaliadas quanto à possibilidade de doença ativa. Uma vez que a doença ativa esteja excluída, todas as pessoas com risco aumentado de progredirem para TB ativa, como os pacientes infectados pelo HIV, devem receber tratamento para infecção latente realizado com isoniazida (DOOLEY; STERLING, 2005). A isoniazida é comprovadamente eficaz em reduzir o risco de reativação de infecção latente em pacientes infectados pelo HIV com PPD positivo (PADMAPRIYADARSINI; SWAMINATHAN, 2005; BUCHER *et al.*, 1999) além de estar associado com aumento da sobrevivência (PINHO *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 1997). Nesta pesquisa, o uso de

quimioprofilaxia para TB com isoniazida foi igual entre os grupos analisados. Entretanto, nenhuma observação quanto ao efeito do uso da quimioprofilaxia pode ser considerada devido ao pequeno número de pacientes que fizeram uso dessa medida.

### **5.3 Fatores relacionados à infecção pelo HIV**

A infecção pelo HIV aumenta enormemente o risco para TB, mas a extensão do aumento varia em diferentes estudos. Quanto tempo depois da infecção pelo HIV o risco para TB aumenta e como esse risco muda com o tempo desde a soroconversão para HIV foram estudados. Entretanto, para uma conclusão consistente, ainda necessita-se de outros estudos, uma vez que as pesquisas apresentam diferentes desenhos e populações de estudo.

Sonnenberg *et al.* (2005) realizou um estudo de coorte retrospectivo em uma população específica de mineradores de ouro na África do Sul no qual notou que o risco de TB dobra no primeiro ano de infecção pelo HIV e continua crescendo de forma mais leve nos anos seguintes. Em outro estudo, uma coorte prospectiva realizada com usuários de drogas injetáveis de vários países da Europa, o risco de TB aumentou quase três vezes na faixa de 4 a 6 anos após a infecção pelo HIV e cinco vezes após 9 anos comparados com o risco observado nos três primeiros anos da infecção (ASTEN *et al.*, 2003). Entretanto, ambos os trabalhos, sugeriram que, logo após a infecção pelo HIV, o aumento do risco de TB deva-se a reativação de infecção latente, e que, com o passar do tempo, a importância da infecção recente torna-se mais proeminente.

No presente estudo, não foi possível escalonar o risco em relação ao tempo de infecção pelo HIV. Entretanto, a média de tempo observada desde o diagnóstico de infecção pelo HIV e o diagnóstico da TB não foram significativamente diferentes do tempo de infecção do HIV nos pacientes controles.

Segundo a classificação do CDC (1992), que define as doenças definidoras de aids, a tuberculose pulmonar e/ou a extrapulmonar são classificadas doenças definidoras. Como essa classificação é aceita e utilizada mundialmente, optou-se por usá-la nesta pesquisa. Desta feita, todos os pacientes do grupo dos co-infectados TB-HIV apresentavam classificação clínica C. Assim, a diferença entre os percentuais de pacientes com classificação clínica C entre os grupos estudados é significativa ( $p=0,0000$ ). Uma possível deficiência deste estudo foi a não realização da classificação clínica antes do diagnóstico da TB.

Jones *et al.* (2000), analisando a co-infecção TB-HIV na era da HAART, relatou como fator de risco para TB a presença prévia, em relação ao momento de diagnóstico da TB, de doença oportunista definidora de aids, com exceção da TB. Em um estudo realizado em Londres para avaliar a evolução da TB associada à infecção pelo HIV antes e após a era HAART observou que, na era HAART, 43,3% dos pacientes tinham definição prévia de aids (DHEDA *et al.*, 2004). No Brasil, em um estudo de prevalência e para avaliação dos fatores relacionados à TB em um centro de referência no Rio Grande do Sul, 49,5% dos pacientes apresentavam diagnóstico de aids (SILVEIRA *et al.*, 2006).

O papel essencial dos linfócitos T CD4+ na imunidade contra o *M. tuberculosis* através da produção de citocinas para ativação de macrófagos e de sua atividade microbicida própria está bem estabelecido (FITZGERALD; HAAS, 2005). Nos pacientes co-infectados pelo HIV, a depleção de células T CD4+ causada pelo HIV contribui para a disseminação da TB nesta população.

A literatura é extensa e direta em relacionar a depleção de linfócitos T CD4+ e o desenvolvimento da TB. Em vários estudos epidemiológicos em populações infectadas pelo HIV realizados em diferentes países, a média observada da contagem de linfócitos T CD4+ foi persistentemente abaixo de 200 cels/ $\mu$ L: 187 cels/ $\mu$ L (SILVEIRA *et al.*, 2006), 120 cels/ $\mu$ L (GIRARDI *et al.*, 2004) e 112 cels/ $\mu$ L (CASTILLA *et al.*, 1997). Em alguns estudos, a baixa contagem de linfócitos T CD4+, principalmente abaixo de 100 cels/ $\mu$ L, tem sido relacionada como fator risco para o desenvolvimento de TB ativa em pacientes soropositivos para o HIV (SILVEIRA *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2000). Ademais, a baixa contagem de linfócitos T CD4+ tem sido descrita como um significativo fator preditor de morte e de desenvolvimento de nova doença definidora de aids (DHEDA *et al.*, 2004).

Corroborando os dados da literatura, o grau de imunossupressão foi significativamente maior na população co-infectada TB-HIV que no grupo controle ( $p < 0,0001$ ), com média de células T CD4+ de 168 cels/ $\mu$ L. Conseqüentemente, a maioria dos pacientes apresentou classificação imunológica 3 no mesmo grupo co-infectado TB-HIV e a diferença foi significativa quando comparado aos controles.

Em relação à carga viral plasmática, nesse estudo os pacientes com TB tiveram maior carga viral plasmática que os controles ( $p=0,0013$ ) com média do logaritmo da carga viral de 4,36. Este fato pode estar relacionado tanto ao avançado estágio clínico dos pacientes co-infectados TB-HIV, com avançado grau de imunossupressão. Em um estudo de coorte para

avaliação dos efeitos da HAART na incidência da TB na África do Sul, a média do logaritmo da carga viral observada no grupo sem uso de HAART foi de 5,4 (BADRI; WILSON; WOOD, 2002).

A alta replicação viral nestes pacientes também pode ser causada pelo contato com o *M. tuberculosis* (HAVLIR; BARNES, 1998). Toossi *et al.* (1997) e Goletti *et al.* (1996) demonstraram que a exposição *in vitro* de macrófagos alveolares e linfócitos de pacientes infectados pelo HIV ao *M. tuberculosis* causa uma regulação positiva da replicação viral. Além disso, o fluido pleural de pacientes com TB aumenta a replicação viral em linfócitos ativados (GARRAIT *et al.*, 1997), e, em pacientes com TB e infectados pelo HIV, a concentração de RNA viral em fluido de lavado broncoalveolar é maior em áreas de envolvimento tuberculoso (NAKATA *et al.*, 1997). O *M. tuberculosis* provavelmente aumenta a replicação do HIV por induzir os macrófagos a produzir fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucina- 1 e interleucina- 6 (GARRAIT *et al.*, 1997; NAKATA *et al.*, 1997).

Recentemente, estudos têm demonstrado o impacto da HAART na sobrevivência dos pacientes infectados pelo HIV com efetiva restauração imunológica e redução na morbidade e mortalidade (CASCADE, 2000). Ademais, o tratamento da infecção pelo HIV está associado à redução no risco de desenvolvimento de TB ativa (GIRARDI *et al.*, 2004; WILLIAMS; DYE, 2003; JONES *et al.*, 2000), do risco imediato e em longo prazo de morte e de desenvolvimento de uma nova doença definidora de aids em pacientes co-infectados TB-HIV (DHEDA *et al.*, 2004) e na incidência da TB nesses pacientes (BADRI; WILSON; WOOD, 2002).

Esses dados contrastam com a nossa casuística nos pacientes co-infectados TB-HIV que mostraram uma maior frequência de uso de HAART nesta população, inclusive com risco maior de desenvolvimento de TB nos pacientes com uso de HAART. As condições sob as quais as drogas ARV podem prevenir fração significativa dos casos de TB requerem tratamento precoce no curso da infecção pelo HIV associado à alta cobertura e alta adesão. Entretanto, houveram limitações neste estudo relacionadas à terapia antiretroviral (TARV). Primeiro, o tempo de início dos antiretrovirais não foi investigado. Segundo, não foi analisada satisfatoriamente a segurança, a adesão e a eficácia do regime de TARV nos pacientes. E, por último, para um número dos pacientes, os resultados e as causas definitivas da morte não puderam ser determinados, tanto porque os pacientes não retornaram ao hospital como devido ao fato de terem falecido fora do hospital.

#### 5.4 Diagnóstico da co-infecção micobacteriose-HIV

O diagnóstico dos casos de micobacteriose foi estabelecido baseado na baciloscopia e/ou cultura de qualquer amostra clínica, com exame histopatológico compatível ou mostrando a presença de BAAR, assim como através da história clínica e epidemiológica, exames radiológicos sugestivos da forma ativa da doença e na resposta ao tratamento específico. Também foi levada em consideração a resposta ao PPD.

O PPD, um tipo de teste de hipersensibilidade cutânea, é usado como método auxiliar no diagnóstico da TB, assim como para identificar casos nos quais a quimioprofilaxia com isoniazida esteja indicada. Entre pessoas com sintomas e achados clínicos de TB, o teste tuberculínico pode prover informações diagnósticas úteis (HOPEWELL, 1994). Entre pacientes com TB e infecção pelo HIV, a frequência da reação tuberculínica positiva varia consideravelmente dependendo do grau de comprometimento imune (FITZGERALD; HAAS, 2005; SHAFER; EDLIN, 1996; RIEDER *et al.*, 1989).

No presente estudo, em um total de 208 pacientes estudados, somente menos da metade dos pacientes (43,26%) realizou o PPD. Deste total, 76,66% apresentavam resultado não-reator enquanto 23,33% eram reatores. Kerr-Pontes, Oliveira e Freire (1997), em um estudo realizado com os pacientes infectados pelo HIV na mesma instituição durante o período de 1985 a 1992, observaram resultado semelhante tanto em relação à não realização do exame (45,7%) como ao percentual de não-reatores (77,1%). No entanto, no referido estudo, não foi investigado o nível de imunossupressão.

Diferentemente dos pacientes com diagnóstico somente de TB, os indivíduos co-infectados com TB-HIV normalmente apresentam-se como não-reatores ao PPD. Alguns autores que estudaram indivíduos com TB pulmonar sem HIV encontraram 75% de resposta forte reator ao PPD (NASH, 1980). Enquanto outros encontraram que a maioria dos indivíduos co-infectados TB-HIV era não-reator (MARKOWITZ *et al.*, 1993; GRAHAM *et al.*, 1992; BETHLEM *et al.*, 1990; CANESSA *et al.*, 1989). A resposta fraca ao PPD entre pacientes com HIV é certamente devido às alterações na resposta imune celular causada pelo vírus, o que leva a anergia (SOUSA, 2006; MAAS *et al.*, 1999).

Quanto à relação entre contagem de linfócitos T CD4 + e a reação cutânea ao PPD, não foi observado diferença significativa entre indivíduos reatores e não-reatores. Entretanto, há uma tendência da contagem de linfócitos T CD4 + ser menor nos pacientes não-reatores (média de 165 cels/mm<sup>3</sup>) que nos reatores (média de 232 cels/mm<sup>3</sup>).

Na literatura, a relação entre o número de células T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> e a reação ao PPD permanece um assunto sem resolução. Souza *et al.* (2006b), em um estudo retrospectivo realizado com pacientes com infecção pelo HIV ou com aids acompanhados em São Paulo, não observou diferença significativa em termos de média CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> entre os pacientes reatores e não-reatores ao PPD. Esses dados são semelhantes aos de outros estudos (MORENO *et al.*, 1995; MORENO *et al.*, 1993). Em contraste, outros autores reportaram anergia em somente 10% dos indivíduos HIV positivos com contagem de células T CD4<sup>+</sup> igual a 500cels/mm<sup>3</sup>, comparados com aproximadamente 60% naqueles com contagem de células T CD4<sup>+</sup> igual a 200cels/mm<sup>3</sup> (MAAS *et al.*, 1999). Souza *et al.* (2006b) também enfatiza que, apesar de não ter observado diferença na contagem média de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, a contagem mínima foi menor entre os não-reatores que entre os reatores.

Em pacientes com TB infectados pelo HIV, a natureza dos achados radiológicos também depende do grau de imunossupressão produzido pela infecção (HOPEWELL, 1994; BATUNGWANAYO *et al.*, 1992; SHAFER *et al.*, 1991). Naqueles com contagem de celular T CD4<sup>+</sup> igual ou maior 200 cels/mm<sup>3</sup>, os achados radiológicos do pulmão incluem infiltrados em lobos superiores e cavitação que são similares àqueles em pacientes sem infecção pelo HIV. Nos pacientes com contagem de celular T CD4<sup>+</sup> menor que 200 cels/mm<sup>3</sup>, os achados radiológicos tornam-se mais atípicos: a cavitação é incomum, os infiltrados intersticiais difusos e nas regiões inferiores dos pulmões além de adenopatias mediastinais são freqüentes (PERLMAN *et al.*, 1997; HOPEWELL, 1994).

Apesar do exame radiológico do tórax ser usualmente o primeiro exame diagnóstico em países em desenvolvimento, na presente casuística 25% de 40 pacientes não realizou tal procedimento. Do restante dos pacientes, 76,7% apresentavam achados radiológicos anormais e 23,3% tinham exame radiológico normal. Achados semelhantes têm sido descritos na literatura. Perlman *et al.* (1997) estudaram as variações dos padrões de raios-X de tórax em pacientes com TB pulmonar associando-os ao grau de imunossupressão relacionado ao HIV e evidenciou que 92% os pacientes tinham padrões radiológicos anormais. Além disso, vários autores têm observado ausência de alterações radiológicas em pacientes infectados pelo HIV com TB pulmonar (MANIAR *et al.*, 2006; GREENBERG, 1994; SMALL *et al.*, 1994; PEDRO-BOTET *et al.*, 1992). Acredita-se que aproximadamente 5% dos pacientes infectados pelo HIV com TB pulmonar têm baciloscopia positiva apesar de terem radiografias de tórax normais (PERLMAN *et al.*, 1997).

A baciloscopia e a cultura são exames complementares de extrema importância para o diagnóstico e acompanhamento da co-infecção TB/HIV. Os pacientes co-infectados são menos prováveis de terem baciloscopia positiva e são considerados menos transmissores porque à medida que a imunossupressão aumenta, as apresentações pulmonares atípicas predominam e a baciloscopia torna-se menos sensível (BRODIE; SCHLUGER, 2005; NARAIN; LO, 2004; COLEBUNDERS; BASTIAN, 2000). Além disso, o diagnóstico da forma extrapulmonar, especialmente envolvendo tecidos profundos de áreas inacessíveis, é bastante difícil (SHARMA; MOHAN, 2004b).

Vários estudos têm encontrado que a TB pulmonar com baciloscopia negativa é mais freqüente em pacientes infectados pelo HIV (ALPERT *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1998; PARRY *et al.*, 1995; ELLIOT *et al.*, 1993; COLEBUNDERS *et al.*, 1989). Elliot *et al.* (1993), por exemplo, em estudo realizado na Zâmbia, encontraram que 43% de 72 pacientes HIV positivos com TB pulmonar comprovada por cultura tinham baciloscopia negativa comparados com 24% de 37 pacientes HIV negativos ( $p=0,003$ ). No presente estudo, a freqüência de pacientes com baciloscopia negativa também foi significativa (59,13%).

Outros pesquisadores, entretanto, não têm detectado diferenças nas taxas de positividade de baciloscopia entre pacientes HIV positivos e negativos (DALEY *et al.*, 1996; GITHUI *et al.*, 1992; LONG *et al.*, 1991). A aparente discrepância nestes estudos pode ser devido a diferenças na população estudada como nível de imunossupressão, local de condução do estudo e técnica utilizada na baciloscopia.

Neste trabalho, um percentual importante (34,13%) dos pacientes não realizou cultura para micobactérias enquanto que Kerr-Pontes, Oliveira e Freire (1997), em casuística local, observaram uma freqüência de 54,3% de casos em que não foram realizadas culturas. Deste modo, houve um incremento importante na freqüência de solicitação de culturas. No entanto, é necessário que a cultura seja solicitada em todos os casos suspeitos de tuberculose em pacientes infectados pelo HIV, uma vez que sua sensibilidade é maior comparado ao da baciloscopia. Aproximadamente 5.000 a 10.000 bacilos álcool-ácido resistentes por mililitro da amostra devem estar presentes para detecção pela baciloscopia enquanto a cultura necessita somente 10 a 100 organismos viáveis (BRODIE; SCHLUGER, 2005; ROUILLON; PERDRIZET; PARROT, 1976).

Outros dados deste trabalho também ajudam a justificar a necessidade da solicitação de cultura em todos os casos suspeitos de micobacteriose: 12,5% dos pacientes apresentaram

baciloscopia negativa com cultura positiva e esses números poderiam ser maiores, pois 24,04% dos pacientes com baciloscopia negativa não realizaram cultura. O fato de uma pequena parte dos pacientes terem pesquisa positiva e cultura negativa pode estar relacionado a problemas no procedimento do cultivo das amostras.

A TB extrapulmonar localizada representou, neste trabalho, 28,40% enquanto que a TB disseminada foi observado em 25,92% dos pacientes. Tal observação provavelmente está relacionada ao avançado grau de imunossupressão dos pacientes, cuja média de linfócitos T CD4+ foi de 169 células. Alguns pesquisadores também relataram percentuais semelhantes. Girardi *et al.* (2004) realizou um estudo na Itália para avaliar a co-infecção TB-HIV no contexto da HAART e observou que 19,1% dos pacientes apresentavam TB extrapulmonar isolada e 25,4% a forma disseminada. Outro estudo, realizado em Londres, observou uma frequência de 43,3% de TB extrapulmonar na era pós-HAART (DHEDA *et al.*, 2004). Watanabe e Rufino-Neto (2001) avaliaram o perfil epidemiológico da TB em hospital terciário do estado de São Paulo e observaram que 40,5% dos casos de TB em pacientes infectados pelo HIV eram das formas extrapulmonares e disseminadas. Ademais, Sharma e Mohan (2004b), em estudos na Índia, relataram que a TB extrapulmonar, incluindo a disseminada, é responsável por mais de 50% dos casos de TB em pacientes infectados pelo HIV. Por outro lado, outros autores observaram em suas casuísticas um pequeno percentual de casos de TB extrapulmonar (VAN DER WERF *et al.*, 2006; KERR-PONTES; OLIVEIRA; FREIRE, 1997). No entanto, não foi avaliado o nível de imunossupressão das populações estudadas nos referidos trabalhos.

A apresentação clínica da TB em pacientes infectados pelo HIV depende do grau de imunossupressão resultante da infecção pelo HIV (SHARMA; MOHAN; KADHIRAVAN, 2005; JONES *et al.*, 1993). Em pacientes com a função imune relativamente intacta (linfócitos T CD4 + >200 cels/mm<sup>3</sup>), a forma pulmonar é mais freqüentemente observada que a forma extrapulmonar (ZUMLA, 2000; CASTILLA *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1993). À medida que a imunossupressão progride, a forma extrapulmonar torna-se cada vez mais comum. Contrastando com os pacientes HIV negativos com TB extrapulmonar, a doença é mais freqüentemente disseminada, envolvendo dois ou mais órgãos não contíguos, em pacientes infectados pelo HIV (FITZGERALD; HAAS, 2005; SHARMA *et al.*, 2004c).

Em uma revisão, a média da contagem de linfócitos T CD4 + em pacientes com TB pulmonar variou de 250 a 500 cels/ $\mu$ L (DE COCK *et al.*, 1992). Em comparação, a média da contagem de linfócitos T CD4 + foi de 242 cels/ $\mu$ L em um estudo de pacientes com TB

extrapulmonar localizada e variou de 70 a 79 cels/ $\mu$ L em dois estudos com pacientes com TB disseminada ou miliar (DE COCK *et al.*, 1992; BARBER; CRAVEN; MCCABE, 1990). Castilla *et al.* (1997), comparando as diferenças epidemiológicas da TB pulmonar e extrapulmonar no momento do diagnóstico de aids na Espanha, relataram que a maioria dos pacientes TB extrapulmonar (75,3%) e pulmonar (68,7%) apresentavam contagem de linfócitos T CD4 + abaixo de 200 cels/ $\mu$ L.

No presente estudo, entretanto, não foi observado diferença estatisticamente significativa quanto ao nível de CD4+ entre as formas clínicas, assim como quanto à reação ao PPD, à carga viral plasmática, ao tempo de infecção pelo HIV e ao uso de HAART. Tais fatos podem ser justificados pelo reduzido tamanho amostral quando se faz tais estratificações.

É possível que, em relação à contagem de linfócitos T CD4+, encontrássemos diferença significativa caso houvesse um maior número de pessoas estudadas, pois há uma tendência de que a contagem de linfócitos T CD4 + seja menor nos pacientes com TB extrapulmonar localizada e disseminada.

Em relação ao uso de HAART, alguns vieses estão presentes nesta pesquisa como, por exemplo, a não avaliação da adesão e do tempo de início da terapia em relação ao diagnóstico da micobacteriose.

## **5. 5 TB resistente às drogas**

A OMS estima que aproximadamente 50 milhões de pessoas estejam infectadas com TB-MDR, que é mais difícil e cara de ser tratada, e mais provável de ser fatal (DUCATI *et al.*, 2006). A taxa de mortalidade estimada varia de 40 A 60%, sendo similar à mortalidade dos pacientes com TB não tratados (BLOOM; MURRAY, 1992). Entre alguns dos fatores responsáveis pelo aumento na incidência da TB-MDR estão a epidemia de HIV/aids e o aumento da incidência da TB, especialmente em populações com fácil acesso às medicações anti-TB.

Na população estudada nesta pesquisa, de um total de 34 pacientes com teste de sensibilidade disponível, 4 (11,76%) apresentavam resistência a uma ou mais drogas, a TB-MDR foi observada em 2 (5,89%) casos assim como a resistência a uma única droga, especificamente a isoniazida. Os padrões de resistência em pacientes infectados pelo HIV variam entre os diferentes trabalhos, entretanto a comparação de tais dados entre as pesquisas não pode ser realizada devido às diferenças metodológicas entre eles. Um estudo realizado na Etiópia para investigação da susceptibilidade do *M. tuberculosis* às drogas e a evolução clínica após 24 meses de seguimento

observou 22,3% de resistência a uma ou mais drogas e 5,3% de multiresistência (MDR) (EYOB *et al.*, 2004). Por sua vez, Telzak *et al.* (1999), em um estudo prospectivo e multicêntrico realizado em áreas dos Estados Unidos com taxas de resistência à isoniazida maior que 10% para investigação de preditores de TB-MDR em pacientes infectados pelo HIV, observaram 7,1 % de monoressistência à isoniazida e 10,3% de TB-MDR. Em casuísticas nacionais realizadas em Minas Gerais e Fortaleza com a população geral, as taxas de TB-MDR foram de 2,83% e 17,7% respectivamente (SOUZA; ANTUNES; GARCIA, 2006a; BARROSO *et al.*, 2003; BARROSO *et al.*, 2001). Brito *et al.* (2004), em estudo realizado em um hospital de referência para tratamento da aids no Rio de Janeiro, relataram que resistência a pelo menos 1 droga em 28,85% dos pacientes com HIV/aids. Por outro lado, Murray *et al.* (1999) relataram 10,8% de monoressistência e 1,6% de MDR em mineradores de ouro da África do Sul co-infectados pela TB e HIV. Ademais, levantamento realizado pelo Ministério da Saúde entre os anos de 2000 e 2005 encontrou um percentual de 0,44% de TB-MDR no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005) Esses diferentes padrões de resistência às drogas antituberculose nestas populações podem refletir a transmissão recente da resistência na população geral (VANACORE *et al.*, 2004).

O pequeno tamanho amostral dos pacientes com alguma resistência, inclusive aqueles com TB-MDR, na população desse estudo limitou a possibilidade da identificação de qualquer associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de resistência às drogas e as características dos pacientes.

A revisão da literatura publicada sugere fortemente que o principal fator de risco que contribui para a emergência da TB-MDR é a história prévia de tratamento para TB (SOUZA; ANTUNES; GARCIA, 2006a; SHARMA; MOHAN, 2004; EYOB *et al.*, 2004; BARROSO *et al.*, 2003; NOESKE; NGUENKO, 2002; TELZAK *et al.* 1999). Neste estudo, somente 1 paciente relatou história de tratamento prévio para TB e este também apresentava adesão irregular. Esta resistência secundária ou adquirida, tipicamente ocorre como resultado de terapia antimicrobiana inadequada, que pode ser resultado de não aderência por parte do paciente, da seleção incorreta das medicações, do uso de doses sub-terapêuticas ou de má absorção das drogas (FRIEDEN *et al.*, 1993; PELOQUIN; MACPHEE; BERNING, 1993). Em adição à resistência secundária, a aquisição de cepas com primária resistência está bem estabelecida (ALLAND *et al.*, 1994; SMALL *et al.*, 1994). No atual estudo, 3 dos 4 casos com alguma resistência às drogas negaram ter realizado tratamento prévio para TB e foram categorizadas com tendo resistência primária.

Em relação à evolução clínica, os dois pacientes com TB-MDR ainda permaneciam em acompanhamento ao término do estudo, enquanto os dois com monorresistência a isoniazida tiveram alta por cura. As taxas de mortalidade entre pacientes infectados pelo HIV com TB-MDR freqüentemente excedem 80% e o período entre o diagnóstico e a morte é menor que nos pacientes co-infectados com cepas sensível às drogas. (EYOB *et al.*, 2004; RILEY, 1993; FISCHL *et al.*, 1992).

## 5. 6 Perfil da micobacteriose não-tuberculose

Usualmente as micobactérias não-tuberculose não têm sido isoladas ao nível de espécies e a verdadeira prevalência desta doença não é claramente conhecida.

Na Colômbia, que tem uma pequena taxa de infecção pelo HIV, a prevalência da micobacteriose não-tuberculose isolada em pacientes internados diminuiu discretamente de 5% em 1994 para 4% em 2000, principalmente em pacientes infectados pelo HIV (MURCIA-ARANGUREN *et al.*, 2001). A micobacteriose disseminada causada pelo complexo *Mycobacterium avium* (MAC) entre pacientes infectados com HIV atendidos em uma unidade de referência em aids localizada em São Paulo foi reportada em 18,4% dos pacientes com febre persistente, anemia e leucopenia (BARRETO *et al.*, 1993). Fandinho *et al.* (1997), em um estudo em dois hospitais do Rio de Janeiro, mostraram uma taxa de 37% de MAC em hemoculturas de pacientes com aids suspeitos de micobacteriose disseminada. Em 1999, Conde *et al.* (1999) revisaram os prontuários médicos dos pacientes com culturas positivas para micobactérias, atendidos em um centro de referência em aids no Rio de Janeiro no período de 1993 a 1994, e relatou a identificação em 5,8% das amostras de micobactérias não-tuberculose, sendo 27% destas identificadas como MAC. Ferreira *et al.* (2002), no mesmo hospital de referência no Rio de Janeiro, observaram em 17,8% das amostras a presença de micobactérias não-tuberculose, sendo as mais freqüentes o MAC (65,7%), *M. scrofulaceum* (17,2%), *M. terrae* (8,6%), *M.gordonae* (5,7%), *M.chelonae* (2,8%) e *M. fortuitum* (2,8%). Entretanto, diferenças metodológicas justificam a disparidade nos dados do Rio de Janeiro. Por fim, Saad *et al.* (1997) postularam que o *M. avium* era o principal agente oportunista isolado de pacientes brasileiros com aids.

No presente trabalho, dentre as 39 amostras, 5 (12,82%) apresentavam colônias características de micobactérias não-tuberculose. Quatro amostras foram identificadas como *M. avium*, *M. kansasii*, *M. gordonae* e *M. fortuitum*. O número reduzido das amostras torna infiel a descrição da freqüência de cada espécie assim como não fazer qualquer correlação estatística entre

as variáveis epidemiológicas. Ademais, as diferenças metodológicas entre a presente pesquisa e os estudos citados anteriormente não permitem a comparação dos seus achados.

Todavia, o nível de imunossupressão avançado dos pacientes com micobacteriose não-tuberculosa foi evidente, com contagem de linfócitos T CD4 + variando de 7 a 138 cels/mm<sup>3</sup>. Vários estudos epidemiológicos de pacientes infectados pelo HIV em todo o mundo têm demonstrado que o risco relativo de TB *versus* MAC é diretamente relacionado ao risco de exposição ao *M. tuberculosis* e ao grau de imunossupressão refletido pela contagem de linfócitos T CD4 +. Se o paciente não está sob risco de TB endógena ou exógena e progride para níveis de imunossupressão severa, seu risco de MAC aumenta dramaticamente (VON REYN *et al.*, 1996; GILKS *et al.*, 1995).

Dois dos cinco pacientes apresentaram evolução fatal. Entende-se que, nos pacientes com aids em estado de imunossupressão severa, a doença apresenta evolução mais agressiva e letal e que outras doenças relacionadas ao estado imunológico também possam ter contribuído para o óbito. Entretanto, a demora na identificação da espécie de micobactéria para instituição de terapia adequada possivelmente possa ter contribuído para a evolução dos pacientes.

## 6. Conclusão

O impacto do HIV na TB tem sido devastador em todo o mundo. Mais estudos são necessários para a investigação da prevalência tanto da infecção pelo HIV entre os pacientes com TB como também da TB entre os pacientes com HIV/aids, de suas evoluções clínicas, dos fatores de risco e dos fatores preditores de sucesso das profilaxias e tratamentos em ambas as condições. Estudos como o nosso são importantes para estabelecer estratégias de políticas de saúde públicas mais adequadas para o controle dessas doenças a nível populacional.

Neste trabalho alguns fatores de risco para a co-infecção TB-HIV a nível local foram evidenciados como: o sexo masculino, estado civil solteiro, escolaridade baixa com menos de 8 anos de estudo, contato prévio com portador de TB, tratamento prévio para TB e imunossupressão avançada. Além disso, ficou bem explícita a necessidade de que sejam solicitadas culturas sempre que houver suspeita de micobacteriose na população de pacientes infectados pelo HIV uma vez que foi baixo o percentual de solicitação de culturas para BAAR com TSA nos pacientes co-infectados TB/HIV.

O perfil de resistência aponta a possibilidade de que a prevalência de TB-MDR não seja tão elevada nesta população como usualmente era esperado. Todavia, fazem-se necessários estudos com número maior de amostras para confirmar esta hipótese.

A metodologia PRA para a identificação de NTM mostrou-se exequível e possível de ser utilizada em nosso meio, necessitando somente ser implantada para uso rotineiro e em larga escala, o que reduziria muito o tempo para a identificação das NTM e proporcionaria uma terapêutica direcionada e maior oportunidade de cura para os pacientes.

Este trabalho também enfatiza que apesar do *M. tuberculosis* ser o mais importante causa de micobacteriose, as infecções por micobactéria não-tuberculose devem ser sempre levadas em consideração quando se cuida de pacientes com aids. Apesar dos trabalhos na literatura relatarem a predominância do *M. avium* em isolados de micobactérias não-tuberculose de pacientes internados, ele possivelmente pode não ser o principal agente a nível regional. Entretanto, são necessárias informações mais seguras, obtidas de trabalhos com uma população maior para que possamos confirmar nosso achado.

**SUGESTÕES:**

1. Incrementar a investigação de tuberculose em pacientes infectados pelo HIV principalmente nos pacientes com fatores de risco para a co-infecção TB/HIV.
2. Solicitar sistematicamente cultura para BAAR com TSA em todo paciente com suspeita da co-infecção TB/HIV.
3. Utilizar o método PRA para identificação das micobactérias não-tuberculose;

## REFERÊNCIAS

ALCAIDE, J.; ALTET, M.N.; PLANS, P.; TABERNER, J.L.; SALTÓ, E.; FOLGUERA, L.I.; SALLERAS, L. Cigarette smoking as a risk factor for tuberculosis in young adults: a case-control study. **Tuberc. Lung Dis.**, v. 77, p. 112–116, 1996.

ALLAND, D.; KALKUT, G. E.; MOSS, A. R.; MCADAM, R. A.; HAHN, J. A.; BOSWORTH, W. *et al.* Transmission of Tuberculosis in New York City -- An Analysis by DNA Fingerprinting and Conventional Epidemiologic Methods. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 1710-1716, 1994.

ALLISON, M. R.; MENDOZA, O.; PEZZIA, A. Documentation of a case of tuberculosis in pre-Columbian America. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 107, p. 985-991, 1973.

ALPERT, P.L.; MUNSIF, S.S. GOUREVITCH, M.N.; GREENBERG, B.; KLEIN, R.S. A prospective study of tuberculosis and human immunodeficiency virus infection: clinical manifestations and factors associated with survival. **Clin Infect Dis.** v. 24, p. 661–668, 1997.

ALRAJHI, A.A.; ABDULWAHAB, S.; ALMODOVAR, E.; AL-ABDELY, H.M. Risk factors for drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. **Saudi Med J.** v. 23, p. 305-310, 2002.

AMERICAN THORACIC SOCIETY; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Treatment of Tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 167, p. 602-662, 2003.

ANTONUCCI, G.; GIRARDI, E.; RAVIGLIONE, M.C.; HIPÓLITO, G. Risk factors for tuberculosis in HIV-infected persons: a prospective cohort study. **JAMA**. v. 274, p.143-148, 1995.

ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**. v.53, p. 1785-1789, 2003.

ARANAZ, A.; LIEBANA, E.; GOMEZ-MAMPASO, E.; GALAN, J.C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLAZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **Int J Syst Bacteriol** . v. 49, p. 1263-1273, 1999.

ASTEN, L.V.; LANGENDAM, M.; ZANGERLE, R.; AGUADO, I.H.; BOUFASSA, F.; SCHIFFER, V.; BRETTLE, R.P.; ROBERTSON, J.R.; FONTANET, A.; COUTINHO, R.A.; PRINS, M. Tuberculosis risk varies with the duration of HIV infection: a prospective study of European drug users with known date of HIV seroconversion. **AIDS**. v. 17, p.1201–1208, 2003.

AUBRY, M.C.; WRIGHT, J.L.; MYERS, J.L. The pathology of smoking-related lung diseases. **Clin Chest Med**. v. 21, p.11–35, 2000.

BADRI, M.; WILSON, D.; WOOD, R. Effect of highly active antiretroviral therapy on incidence of tuberculosis in South Africa: a cohort study. **Lancet**. v. 359, p. 2059–2064, 2002.

BALAMURUGAN, A.; SHARMA, S.K.; MEHRA, N.K. Human leukocyte antigen supertypes influence susceptibility and severity of tuberculosis. **J Infect Dis**. v. 189(5), p. 805– 811, 2004.

BARBER, T.W.; CRAVEN, D.E.; MCCABE, W.R. Bacteremia due to *Mycobacterium tuberculosis* in patients with human immunodeficiency virus infection: a report of 9 cases and review of the literature. **Medicine**. v. 69, p. 375-383, 1990.

BARNES, P. F.; MODLIN, R. L.; ELLNER, J.J. T-cell responses and cytokines. *In*: BLOOM, B. R. (Ed.). **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. Washington, DC: ASM press, 1994. p. 417-458.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**. v. 220, p. 868-871, 1983.

BARRETO, J.A.; PALACI, M.; FERRAZOLI, L.; MARTINS, M.C.; SULEIMAN, J.; LOURENÇO, R. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from bone marrow aspirates of AIDS patients in Brazil. **J Infect Dis**. v. 168, p. 777-779, 1993.

BARRY, C.E. Interpreting cell wall 'virulence factors' of *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol**. v. 19, p. 237-241, 3º, 2001.

BARROSO, E.C.; MOTA, R.M.S.; SANTOS, R.O.; SOUSA, A.L.O.; BARROSO, J.B.; RODRIGUES, J.L.N. Fatores de risco para tuberculose multirresistente adquirida. **J Pneumol**. v. 29(2), p. 89- 97, 2003.

BARROSO, E.C.; RODRIGUES, J.L.N.; PINHEIRO, V.G.F.; CAMPELO, C.L. Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. **J Pneumol**. v. 27, p. 310-314, 2001.

BASSO, L.A.; ZHENG, J.M.; MUSSER, J.M.; JACOBS, W.R.J.; BLANCHARD, J.S. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. **J Infect Dis**. v. 178, p. 769-775, 1998.

BASTIAN, I.; RIGOUTS, L.; VAN DEUN, A.; PORTAELS, F. Directly observed treatment, short-course strategy and multidrug-resistant tuberculosis: are any modifications required? **Bull World Health Organ.** v. 78, p. 238-251, 2000.

BATUNGWANAYO, J.; TAELEMAN, H.; DHOTE, R.; BOGAERTS, J.; ALLEN, S.; VAN DE, P. Pulmonary tuberculosis in Kigali, Rwanda: impact of human immunodeficiency virus infection on clinical and radiographic presentation. **Am Rev Respir Dis.** v. 146, p. 53–66, 1992.

BELLAMY, R. Genetic Susceptibility to Tuberculosis. **Clin Chest Med.** v.26, p. 233 – 246, 2005.

BELLAMY, R.; BEYERS, N.; MCADAM, K.P.W.J.; RUWENDE, C.; GIE, R.; SAMAAI, P.; BESTER, D.; MEYER, M.; CORRAH, T.; COLLIN, M.; CAMIDGE, D.R.; DAVID WILKINSON, D.; HELDEN, E.H.; HILTON, C.; WHITTLE, H.C.; AMOSI, W.; HELDEN, P.; HILL, A.V.S. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: A genome-wide scan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 97(14), p. 8005–8009, 2000.

BETHLEM, N.; SOUZA, G.R.M.; BETHLEM, E.P.; SILVA, W.A.E. SIDA/AIDS e tuberculose no Brasil. **Arq Bras Med.** v. 64(1), p. 28-32, 1990.

BLOOM, B.R.; MURRAY, C.J. Tuberculosis: commentary on a re-emergent killer. **Science.** v. 257, p. 1055-1064, 1992.

BOOM, W.H.; CANADAY, D.H.; FULTON, S.A.; GEHRING, A.J.; ROJAS, R.E.; TORRES, M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing **Tuberculosis.** v. 83, p. 98-106, 2003.

BORNMAN, L.; CAMPBELL, S.J.; FIELDING, K.; BAH, B.; SILLAH, J.; GUSTAFSON, P.; MANNEH, K.; LISSE, I.; ALLEN, A.; SIRUGO, G.; SYLLA, A.; AABY, P.; MCADAM, K.P.;

BAH-SOW, O.; BENNETT, S.; LIENHARDT, C.; HILL, A.V. Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in west Africa: a case-control and family study. **J Infect Dis.** v. 190, p. 1631–1641, 2004.

BRAHMAJOTHI, V.; PITCHAPPAN, R.M.; KAKKANAIHAH, V.N.; SASHIDHAR, M.; RAJARAM, K.; RAMU, S.; PALANIMURUGAN, K.; PARAMASIVAN, C.N.; PRABHAKAR, R. Association of pulmonary tuberculosis and HLA in South India. **Tubercle.** v. 72(2), p. 123–132, 1991;

BRENNAN, J.P.; DRAPER, P. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. In BLOOM BR. (Ed.) **Tuberculosis: Pathogenesis, Protection And Control**. Washington, DC: ASM press. 1994. p.271-284.

BRITO, R.C.; GOUNDER, C.; LIMA, D.B.; SIQUEIRA, H.; CAVALCANTI, H.B.; PEREIRA, M.M.; KRITSKI, A.L. Resistência aos medicamentos antituberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. **J Bras Pneumol.** V. 30(4), p. 335-342, 2004.

BRODIE, D.; SCHLUGER, N.W. The Diagnosis of Tuberculosis. **Clin Chest Med.** v. 26, p. 247 - 271, 2005.

BRUDNEY, K.; DOBKIN, J. Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness and the decline of tuberculosis control programs. **Am Rev Respir Dis.** v. 144, p.745-749, 1991.

BUCHER, H.C.; GRIFFITH, L.E.; GUYATT, G.H.; SUDRE, P.; NAEF, M.; SENDI, P.; BATTEGAY, M. Isoniazid prophylaxis for tuberculosis in HIV infection: a metaanalysis of randomized controlled trials. **AIDS.** v. 13(4), p. 501– 507, 1999.

BUSCH, M.P.; SATTEN, G.A. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. **Am J Med.** v. 103, p. 117-126, 1997.

BUSILLO, C.P.; LESSNAU, K.D.; SANJANA, V.; SOUMAKIS, S.; DAVIDSON, M.; MULLEN, M.P.; TALAVERA, W. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with human immunodeficiency virus infection. **Chest.** v. 102, p. 797-801, 1992.

CAMBI, A.; KOOPMAN, M.; FIGDOR, C.G. How C-type lectins detect pathogens. **Cell Microbiol.** v. 7, p. 481-488, 2005.

CANESSA, P.A.; FASANO, L.; LAVECCHIA, M.A.; TORRACA, A.; SCHIATTONE, M.L. Tuberculin skin test in asymptomatic HIV seropositive carriers. **Chest.** v. 96(5), p. 1215-1216, 1989.

CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDOROY, P.; LANGEROVA, M.; MAHLER, H.T.; MEISSNER, G.; MITCHISON, D.A.; SULA, L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. **Bull WHO.** v.29, 565-578, 1963.

CARVALHO, A.C.C.; DERIEMER, K.; NUNES, Z.B.; MARTINS, M.; COMELLI, M.; MARINONI, A.; KRITSKI, A.L. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to Contacts of HIV-infected Tuberculosis Patients. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 164, p. 2166-2171, 2001.

CASCADE COLLABORATION. Survival after introduction of HAART in people with known duration of HIV-1 infection. **Lancet.** v. 335, p. 1158-1159, 2000.

CASTILLA, J.; GUTIÉRREZ, A.; GUERRA, L.; PAZ, J.P.; NOGUER, I.; RUIZ, C.; BELZA, M.J.; CAÑÓN, J. Pulmonary and extrapulmonary tuberculosis at AIDS diagnosis in Spain: epidemiological differences and implications for control. **AIDS.** v. 11, p. 1583-1588, 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevention of tuberculosis among patients infected with human immunodeficiency virus: principles of therapy and revised recommendations. **MMWR**, v. 47, n. RR-20, p. 1-58, 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR**, v. 41, n. RR-17, 1992.

CDC. Projections of the number of persons diagnosed with AIDS and the number of immunosuppressed HIV-infected persons – United States, 1992-1994. **MMWR**. v. 41(RR-18), p. 1-29, 1992.

CHAISSON, R.E.; SCHECTER, G.F.; THEUER, C.P.; RUTHERFORD, G.W.; ECHENBERG, D.F.; HOPEWELL, P.C. Tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: clinical features, response to therapy and survival. **Am Rev Respir Dis**. v. 136, p.570–574, 1987.

CHAN, J.; XING, Y.; MAGLIOZZO, R.; BLOOM, B.R. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **J Exp Med**. v. 175, p. 1111–1122, 1992.

CHASTELLIER, C.; THILO, L. Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles. **Cell Microbiol**. v. 8(2), p. 242-256, 2006.

CLARK-CURTISS, J.E.; JACOBS, W.R.; DOCHERTY, M.A.; RITCHIE, L.R.; CURTISS, R. Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. **J Bacteriol**. v. 161, p. 1093-1102, 3<sup>o</sup>, 1985.

CLEGHORN, F.R. Human Immunodeficiency Viruses. In MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R (Ed.). **Principles and Practice of Infectious Disease**. 6ª edição. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2005. cap. 166, p. 2119-2133.

COLE, S.T. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **FEBS Lett.** v. 452, p. 7-10, 1999.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C.E. III; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. *et al.*. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**. v. 393, p. 537-544, 1998.

COLEBUNDERS, R.; BASTIAN, I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**. v. 4(2), p. 97-107, 2000.

COLEBUNDERS, R.L.; RYDER, R.W.; NZILAMBI, N.; DIKILU, K.; WILLAME, J.C.; KABOTO, M.; BAGALA, N.; JEUGMANS, J.; MUEPU, K.; FRANCIS, H.L. HIV infection in patients with tuberculosis in Kinshasa, Zaire. **Am Rev Respir Dis**. v. 139, p. 1082-1085, 1989.

CONDE, M.B.; FIGUEIRA, C.M.; MORAES, R.; FONSECA, L.S.; DERIEMER, K.; KRITSKI, A.L. Predictive value of the acid-fast smear for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in reference center of Aids/HIV in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 94, p. 787-790, 1999.

CORBETT, E.L.; BANDASON, T.; CHEUNG, Y.B.; MUNYATI, S.; GODFREY-FAUSSETT, P.; HAYES, R.; CHURCHYARD, G.; BUTTERWORTH, A.; MASON, P. Epidemiology of tuberculosis in a high HIV prevalence population provided with enhanced diagnosis of symptomatic disease. **PLoS Med.** v. 4(1), p. 164-172, 2007.

CORONADO, V.G.; BECK-SAGUE, C.M.; HUTTON, M.D.; DAVIS, B.J.; NICHOLAS, P.; VILLAREAL, C.; WOODLEY, C.L.; KILBURN, J.O.; CRAWFORD, J.T.; FRIEDEN, T.R. Transmission of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. **J Infect Dis.** v. 168, p. 1052-1055, 1993.

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 53, p. 1305-1314, 2003.

CRAMPIN, A.C.; GLYNN, J.R.; TRAORE, H.; YATES, M.D.; MWAUNGULU, L.; MWENEBABU, M.; CHAGULUKA, S.D.; FLOYD, S.; DROBNIEWSKI, F.; FINE, P.E.M. Tuberculosis Transmission Attributable to Close Contacts and HIV Status, Malawi. **Emerg Infect Dis.** v. 12 (5), p. 729-735, 2006.

DAAR, E.S.; LITTLE, S.; PITT, J.; SANTANGELO, J.; HO, P.; HARAWA, N.; KERNDT, P.; GLORGI, J.V.; BAI, J.; GAUT, P.; RICHMAN, D.D.; MANDEL, S.; NICHOLS, S.; LOS ANGELES COUNTY PRIMARY HIV INFECTION RECRUITMENT NETWORK. Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network. **Ann Intern Med.** v. 134, p. 25-29, 2001.

DAFFÉ, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their

pathogenicity. **Adv Microb Physiol.** v. 39, p. 131-203, 1998.

DALEY, C.L.; MUGUSI, F.; CHEN, L.L.; SCHMIDT, D.M.; SMALL, P.M.; BEARER, E.; ARIS, E.; MTONI, I.M.; CEGIELSKI, J.P.; LALLINGER, G.; MBAGA, I.; MURRAY, J.F. Pulmonary complications of HIV infection in Dar es Salaam, Tanzania: role of bronchoscopy and bronchoalveolar lavage. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 154, p. 105–110, 1996.

DALEY, C.L. The typically “atypical” radiographic presentation of tuberculosis in advanced HIV disease. **Tuberc Lung Dis.** v. 76, p. 475–476, 1995.

DANIEL, T.M.; BATES, J.H.; DOWNES, K.A. The history of Tuberculosis. In BLOOM BR. (Ed.) **Tuberculosis: Pathogenesis, Protection And Control.** Washington, DC: ASM press. 1994. p.13-24.

DATASUS, 2006. disponível em: < [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br) >. Acesso em: 26 Dez. 2006.

DE COCK, K.M.; SORO, B.; COULIBALY, I.M.; LUCAS, S.B. Tuberculosis and HIV infection in sub-Saharan Africa. **JAMA.** v. 8, p. 1581-1587, 1992.

DEL RIO, C.; CURRAN, J.W. Epidemiology and Prevention of Acquired Immunodeficiency Syndrome and Human Immunodeficiency Virus Infection. In MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R. (Ed.). **Principles and Practice of Infectious Disease.** 6ª edição. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2005. cap. 114, p. 1477-1506.

DHEDA, K.; LAMPE, F.C.; JOHNSON, M.A.; LIPMAN, M.C. Outcome of HIV-Associated Tuberculosis in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. **J Infect Dis.** v. 190, p. 1670–1676, 2004.

DIWAN, V.K.; THORSON, A. Sex, gender, and tuberculosis (Tuberculosis Progress Report). **The Lancet.** v. 353, p. 1000(1), 1999.

DOOLEY, K.E.; STERLING, T.R. Treatment of Latent Tuberculosis Infection: Challenges and Prospects. **Clin Chest Med.** v. 26, p. 313 – 326, 2005.

DRUCKER, E.; ALCABES, P.; BOSWORTH, W.; SCKELL, B. Childhood tuberculosis in the Bronx, New York. **Lancet.** v.343, p. 1482–1485, 1994.

DUBNAU, E.; CHAN, J.; RAYNAUD, C.; MOHAN, V.P.; LANELEE, M.A.; YU, K.; QUEMARD, A.; SMITH, I.; DAFTE, M. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Mol Microbiol.** v. 36, p. 630-637, 2000.

DUCATI, R.G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. The resumption of consumption. A review on tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 101(7), p. 697-714, 2006.

DURACK, D.T. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men. **N Engl J Med.** v. 305, p. 1465, 1981.

DYE, C.; WILLIAMS, B.; ESPINAL, M.A.; RAVIGLIONE, M.C. Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. **Science.** v. 295, p. 2042-2046, 2002.

EDLIN, B.R.; TOKARS, J.I.; GRIECO, M.H.; CRAWFORD, J.T.; WILLIAMS, J.; SORDILLO, E.M.; ONG, K.R.; KILBURN, J.O.; DOOLEY, S.W.; CASTRO, K.G. An outbreak of multidrug resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med.** v. 326, p. 1514-1521, 1992.

ELLIOT, A.M.; NAMAAMBO, K.; ALLEN, B. W.; LUO, N.; HAYES, R. J.; POBEE, J.O.M.; MCADAM, K.P.W.J. Negative sputum smear results in HIV-positive patients with pulmonary tuberculosis in Lusaka, Zambia. **Tubercle Lung Dis.** v. 74, p. 191– 194, 1993.

ESPINAL, M.A.; LASERSON, K.; CAMACHO, M.; FUSHENG, Z.; KIM, S.J.; TLALI, R.E.; SMITH, I.; SUAREZ, P.; ANTUNES, M.L.; GEORGE, A.G.; MARTIN-CASABONA, N.; SIMELANE, P.; WEYER, K.; BINKIN, N.; RAVIGLIONE, M.C. Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 5, p. 887-893, 2001.

ESPINAL, M.A.; PEREZ, E.N.; BAEZ, J.; HENRIQUEZ, L.; FERNANDEZ, K.; LOPEZ, M.; OLIVO, P.; REINGOLD, A.L. Infectiousness of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-1-infected patients with tuberculosis: a prospective study. **Lancet.** V. 355, p.275–280, 2000.

EYOB, G.; GUEBREXABHER, H.; LEMMA, E.; WOLDAY, D.; GEBEYEHU, M.; ABATE, G.; RIGOUTS, L.; SOOLINGEN, D.; FONTANET, A.; SANDERS, E.; DORIGO-ZETSMA, J.W.; Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-infected and -uninfected Ethiopians and its impact on outcome after 24 months of follow-up. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 8(11), p. 1388–1391, 2004.

FANDINHO, F.C.O.; GRINSZTEJN, B.; SANTOS, V.G.V.; LOURENÇO, M.C.S.; WERNECK-BARROSO, E.B.; JOÃO, E.; NOGUEIRA, A.S.; FONSECA, L.S. Diagnosis of disseminated mycobacterial infection: proposal of a simple and non-expensive method to be used in developing countries. **Bul WHO** v. 75, p. 361-366, 1997.

FARIZO, K.M.; BUEHLER, J.W.; CHAMBERLAND, M.E.; WHYTE, B.M.; FROELICHER, E.S.; HOPKINS, S.G.; REED, C.M.; MOKOTOFF, E.D.; COHN, D.L.; TROXLER, S. Spectrum of disease in persons with human immunodeficiency virus infection in the United States. **JAMA.** v. 267, p. 1798-1905, 1992.

FENTON, M.J.; VERMEULEN, M.W. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. **Infect Immun.** v. 64(3), p. 683–690, 1996.

FERGUSON, J.S.; WEIS, J.J.; MARTIN, J.L.; SCHLESINGER, L.S. Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. **Infect Immun.** v. 72, p. 2564–2573, 2004.

FERRARI, G.; LANGEN, H.; NAITO, M.; PIETERS, J.A. Coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. **Cell.** v. 9, p. 435–447, 1999.

FERREIRA, R.M.C.; SAAD, M.H.F.; SILVA, M.G.; FONSECA, L.S. Non-tuberculous Mycobacteria I: One Year Clinical Isolates Identification in Tertiary Hospital Aids Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in Pre Highly Active Antiretroviral Therapy Era. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 97(5), p. 725-729, 2002.

FINKEN, M.; KIRCHNER, P.; MEIER, A.; WREDE, A.; BÖTTGER, E.C. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. **Mol Microbiol.** v. 9, p. 1239-1246, 1993.

FISCHL, M.A.; DAIKOS, G.L.; UTTAMCHANDANI, R.B.; POBLETE, R.B.; MORENO, J.N.; REYES, R.R.; BOOTA, A.M.; THOMPSON, L.M.; CLEARY, T.J.; OLDHAM, S.A. Clinical presentation and outcome of patients with HIV infection and tuberculosis caused by multiple-drug-resistant bacilli. **Ann Intern Med.** v. 117, p. 184-190, 1992.

FITZGERALD, D.; HAAS, D.W. *Mycobacterium tuberculosis*. In MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R (Ed.). **Principles and Practice of Infectious Disease.** 6ª edição. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2005. cap. 248, p. 2852-2886.

FLYNN, J.L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis.** v. 84, p. 93–101, 2004.

FLYNN, J.L.; CHAN, J. Immunology of Tuberculosis. **Annu Rev Immunol.** v. 19, p. 93–129, 2001.

FRIEDEN, T.R.; STERLING, T.; PABLOS-MENDEZ, A.; KILBURN, J.O.; CAUTHEN, G.M.; DOOLEY, S.W. The emergence of drug resistant tuberculosis in New York City. **N Engl J Med.** v. 328, p. 521-526, 1993.

FROTA, C.C. The regulation of gene expression in Mycobacterium tuberculosis (tese). Londres: UCL, 2002.

GALLO, R.C.; SALAHUDDIN, S.Z.; POPOVIC, M.; SHEARER, G.M.; KAPLAN, M.; HAYNES, B.F.; PALKER, T.J.; REDFIELD, R.; OLESKE, J.; SAFAI, B. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science.** v. 224, p. 500-503, 1984.

GALLO, R.C.; SARIN, P.S.; GELMANN, E.P.; ROBERT-GUROFF, M.; RICHARDSON, E.; KALYANARAMAN, V.S.; MANN, D.; SIDHU, G.D.; STAHL, R.E.; ZOLLA-PAZNER, S.; LEIBOWITZ, J.; POPOVIC, M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science.** v. 220, p. 865-867, 1983.

GARRAIT, V.; CADRANEL, J.; ESVANT, H.; HERRY, I.; MORINET, P.; MAYAUD, C.; ISRAËL-BIET, D. Tuberculosis generates a microenvironment enhancing the productive infection of local lymphocytes by HIV. **J Immunol.** v. 159, p. 2824-2830, 1997.

GEIJTENBEEK, T.B.; VAN VLIET, S.J.; KOPPEL, E.A.; SANCHEZ-HERNANDEZ, M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; APPELMELK, B.; VAN KOOYK, Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J Exp Med.** v. 197, p. 7–17, 2003.

GILKS, C.F.; BRINDLE, R.J.; MWACHARI, C.; BATCHELOR, B.; BWAYO, J.; KIMARI, J.; ARBEIT, R.D.; VON REYN, C.F. Disseminated Mycobacterium avium infection among HIV-

infected patients in Kenya. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** v. 8, p. 195–198, 1995.

GILLERON, M.; QUESNIAUX, V.F.; PUZO, G. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. **J Biol Chem.** v. 278, p. 29880-29889, 2003.

GIRARDI, E.; ANTONUCCI, G.; VANACORE, P.; PALMIERI, F.; MATTEELLI, A.; IEMOLI, E.; CARRADORI, S.; SALASSA, B.; PASTICCI, M.B.; RAVIGLIONE, M.C.; IPPOLITO, G.; THE GISTA–SIMIT STUDY GROUP. Tuberculosis in HIV-infected persons in the context of wide availability of highly active antiretroviral therapy. **Eur Respir J.** v. 24, p. 11-17, 2004.

GITHUI W, NUNN, P.; JUMA, E.; KARIMI, F.; BRINDLE, R.; KAMUNYI, R.; GATHUA, S.; GICHEHA, C.; MORRIS, J.; OMWEGA, M. Cohort study of HIV-positive and HIV-negative tuberculosis, Nairobi, Kenya: comparison of bacteriological results. **Tubercle Lung Dis.** v. 73, p. 203–209, 1992.

GOLDFELD, A.E.; DELGADO, J.C.; THIM, S.; BOZON, M.V.; UGLIALORO, A.M.; TURBAY, D.; COHEN, C.; YUNIS, E.J. Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. **JAMA.** V. 279(3), p. 226–228, 1998;

GOLETTI, D.; WEISSMAN, D.; JACKSON, R.W.; GRAHAM, N.M.; VLAHOV, D.; KLEIN, R.S.; MUNSIF, S.S.; ORTONA, L.; CAUDA, R.; FAUCI, A.S. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication: role of immune activation. **J Immunol.** v. 157, p. 1271-1278, 1996.

GOREN, M.; D'ARCY, H.P.; YOUNG, M.R.; ARMSTRONG, J.A. Prevention of phagosomelysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Nat Acad Sci USA**. v. 73, p. 2510– 2514, 1976.

GOTTLIEB, M.S.; SCHROFF, R.; SCHANKER, H.M.; WEISMAN, J.D.; FAN, P.T.; WOLF, R.A.; SAXON, A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquires cellular immunodeficiency. **N Engl J Med**. v. 305, p. 1425-1438, 1981.

GRAHAM, N.M.; NELSON, K.E.; SOLOMON, L.; BONDS, M.; RIZZO, R.T.; SCAVOTTO, J.; ASTEMBORSKI, J.; VLAHOV, D. Prevalence of tuberculin positivity and skin test anergy in HIV-1-seropositive and - seronegative intravenous drug users. **JAMA**. v. 267 (3), p. 369-373, 1992.

GREENBERG, S.D.; FRAGER, D.; SUSTER, B.; WALKER, S.; STAVROPOULOS, C.; ROTHPEARL, A. Active pulmonary tuberculosis in patients with AIDS: spectrum of radiographic findings (including a normal appearance). **Radiology**. v. 193, p. 115–119, 1994.

GREENBERG, A.E.; THOMAS, P.A; LANDESMAN, S.H.; MILDVAN, D.; SEIDLIN, M.; FRIEDLAND, G.H.; HOLZMAN, R.; STARRETT, B.; BRAUN, J.; BRYAN, E.L. The spectrum of HIV-1 related disease among outpatients in New York City. **AIDS**. v. 6, p. 849-859, 1992.

GTI - GLOBAL TUBERCULOSIS INSTITUTE. NEW JERSEY MEDICAL SCHOOL. Brief history of tuberculosis. Disponível em:< <http://www.umdnj.edu/ntbcweb/tbhistory.htm>>. Acesso em: 25 Dec. 2006.

GUWATUDDE, D.; KAMYA, R.; NAKAKEETO, M.; MUSOKE, P.; BUKENYA, G.; OKWERA, A.; MUGERWA, R.; ELLNER, J.; WHALEN, C. The impact of HIV infection on transmission of tuberculosis (TB) (Abstract 703). **Am J Epidemiol**. v.153 (Suppl.):S193, 2001.

HARTH, G.; HORWITZ, M.A. An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets. **J Exp Med.** v. 189, p. 1425–1435, 1999.

HAVLIR, D.V.; BARNES, P.F. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med.** v. 340, p. 367-373, 1998.

HENN, L.A.; JOHN, A.B. Tuberculostáticos. In BARROS E, BITTENCOURT H, CARAMORI ML, MACHADO A. (Ed). **Antimicrobianos – Consulta Rápida.** 3ª edição. São Paulo. Artmed Editora, 2002, p. 253-265.

HENN, L.; NAGEL, F.; DAL PIZZOL, F. Comparison between Human Immunodeficiency Virus Positive and Negative Patients with Tuberculosis in Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 94(3), p. 377-381, 1999.

HILL, P.C.; JACKSON-SILLAH, D.; DONKOR, S.A.; OUT, J.; ADEGBOLA, R.A.; LIENHARDT, C. Risk factors for pulmonary tuberculosis: a clinic-based case control study in The Gambia. **BMC Public Health.** v. 6, p. 156-162, 2006.

HINGLEY-WILSON, S.M.; SAMBANDAMURTHY, V.K.; JACOBS, W.R.J. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. **Nat Immunol.** v. 4(10), p. 949-955, 2003.

HO, J.L. Co-Infection with HIV and *Mycobacterium tuberculosis*: Immunologic Interactions, Disease Progression, and Survival. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 91(3), p. 385-387, 1996.

HOLMES, C.B.; HAUSLER, H.; NUNN, P. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 2(2), p. 96-104, 1998.

HOPEWELL, P.C. Overview of Clinical Tuberculosis. In BLOOM BR. (Ed.) **Tuberculosis: Pathogenesis, Protection And Control**. Washington, DC: ASM press. 1994. p.25-46.

JOHNSON, J.L.; VJECHA, M.J.; OKWERA, A.; HATANGA, E.; BYEKWASO, F.; WOLSKI, K.; AISU, T.; WHALEN, C.C.; HUEBNER, R.; MUGERWA, R.D.; ELLNER, J.J. Impact of human immunodeficiency virus type-1 infection on the initial bacteriologic and radiographic manifestations of pulmonary tuberculosis in Uganda. **Int J Tuberc Lung Dis**. v. 2, p. 397–404, 1998.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS). **2006 report on the global AIDS epidemic**. Genova. Suíça. UNAIDS, 2006.

JONES, J.L.; HANSON, D.L.; DWORKIN, M.S.; DECOCK, K.M.; THE ADULT/ADOLESCENT SPECTRUM OF HIV DISEASE GROUP. HIV-associated tuberculosis in the era of highly active antiretroviral therapy. **Int J Tuberc Lung Dis**. v. 4(11), p.1026–1031, 2000.

JONES, B.E.; YOUNG, S.M.; ANTONISKIS, D.; DAVIDSON, P.T.; KRAMER, F.; BARNES, P.F. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. **Am Rev Respir Dis**. v. 148, p. 1292-1297, 1993.

KAHN, J.O.; WALKER, B.D. Current concepts: Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **Engl J Med**. v. 339, p. 33-39, 1998.

KANG, P.B.; AZAD, A.K.; TORRELLES, J.B.; KAUFMAN, T.M.; BEHARKA, A.; TIBESAR, E.; DESJARDIN, L.E.; SCHLESINGER, L.S. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. **J Exp Med**. v. 202, p. 987–999, 2005.

KAPLAN, G.; FREEDMAN, V.H.; RUSSELL, D.; COLSTON, M.J. Tuberculosis research comes of age. Keystone Symposium on Tuberculosis: Molecular Mechanisms and Immunologic Aspects. **Mol Med Today**. v. 4, p.330-333, 1998.

KASAI, H.; EZAKI, T.; HARAYAMA, S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. **J Clin Microbiol**. v. 38, p. 301-308, 2000.

KAUFMANN, S.H.E. Tuberculosis: Back on the Immunologists' Agenda. **Immunity**. v. 24, p. 351–357, 2006.

KAUFMANN, S.H.E. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **Trends Immunol**. v. 26, p. 660–667, 2005.

KAUFMANN, S.H.; MCMICHAEL, A.J. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. **Nat Med**. v. 11, p. S33–S44, 2005.

KAUFMANN, S.H.; WINAU, F. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. **Nat Immunol**. v. 6, p. 1063–1066, 2005.

KERR-PONTES, L.R.S.; OLIVEIRA, F.A.S.; FREIRE, C.A.M. Tuberculose associada à AIDS: situação de região do Nordeste brasileiro. **Rev. Saúde Pública**. v. 31(4), p. 323-329, 1997.

KERR-PONTES, L.R.S. **Comportamento epidemiológico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana na Região de Ribeirão Preto**, 1984 a 1991. Ribeirão Preto, 1992. [Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP].

KIM, B.J.; LEE, S.H.; LYU, M.A.; KIM, S.J.; BAI, G.H.; KIM, S.J.; CHAE, G.T.; KIM, E.C.; CHA, C.Y.; KOOK, Y.H. Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). **J Clin Microbiol.** v. 37, P. 1714-1720, 1999.

KOCH, R. The aetiology of tuberculosis (english translation). In CLENDENING L. **Source Book of Medical History.** New York: Dover publications. 1932. p. 392-406.

KOLAPPAN, C.; GOPI, P.G. Tobacco smoking and pulmonary tuberculosis. **Thorax.** v. 57, p. 964–966, 2002.

LADEL, C.H.; SZALAY, G.; REIDEL, D.; KAUFMANN, S.H.E. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. **Infect Immun.** v. 65, p. 1936–1938, 1997.

LEÃO, S.C.; MARTÍN, A.; MEJIA, G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria.** 2004.

LEE, A.S.; LIM, I.H.; TANG, L.L.; TELENTI, A.; WONG, S.Y. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *M. tuberculosis* in Singapore. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 43, p. 2087-2089, 1999.

LEVY, J.A.; HOFFMAN, A.D.; KRAMER, S.M.; LANDIS, J.A.; SHIMABUKURO, J.M.; OSHIRO, L.S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science.** v. 225, p. 840-842, 1984.

LIENHARDT, C.; FIELDING, K.; SILLAH, J.S.; BAH, B.; GUSTAFSON, P.; WARNDORFF, D.; PALAYEW, M.; LISSE, I.; DONKOR, S.; DIALLO, S.; MANNEH, K.; ADEGBOLA, R.; AABY, P.; BAH-SOW, O.; BENNETT, S.; MCADAM, K. Investigation of the risk factors for

tuberculosis: a case-control study in three countries in West Africa. **Int J Epidemiol.** v. 34, p. 914-923, 2005.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J Immunol.** v. 145, p. 4306-4310, 1990.

LIMA, M.M.; BELLUOMINI, M.; ALMEIDA, M.M.M.B.; ARANTES, G.R. Co-infecção HIV/tuberculose: necessidade de uma vigilância mais efetiva. **Rev. Saúde Pública.** v. 31(3), p. 217-220, 1997.

LONG, R.; SCALCINI, M.; MANFREDA, J.; CARRÉ, G.; PHILIPPE, E.; HERSHFIELD, E.; SEKLA, L.; STACKIW, W. Impact of human immunodeficiency virus type 1 on tuberculosis in rural Haiti. **Am Rev Respir Dis.** v. 143, p. 69-73, 1991.

LUNN, G.; SANSONE, E.B. Ethidium bromide: destruction and descontamination of solutions. **Anal Biochem.** v. 162(2), p. 453-8, 1987.

MAHER, D.; RAVIGLIONE, M.C. Global Epidemiology of Tuberculosis. **Clin Chest Med.** v. 26, p.167 – 182, 2005.

MALIK, Z.A.; IYER, S.S.; KUSNER, D.J. *Mycobacterium tuberculosis* Phagosomes Exhibit Altered Calmodulin-Dependent Signal Transduction: Contribution to Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion and Intracellular Survival in Human Macrophages. **J Immunol.** v.166, p. 3392-3401, 2001.

MANIAR, J.K.; KAMATH, R.R.; MANDALIA, S.; SHAH, K.; MANIAR, A. HIV and tuberculosis: Partners in crime. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.** v .72(4), p. 276-282, 2006.

MARKOWITZ, N.; HANSEN, N.I.; WILCOSKY, T.C.; HOPEWELL, P.C.; GLASSROTH, J.; KVALE, P.A.; MANGURA, B.T.; OSMOND, D.; WALLACE, J.M.; ROSEN, M.J.; REICHMAN, L.B. Tuberculin and anergy testing in HIV-seropositive and HIV-seronegative persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. **Ann Intern Med.** v. 119(3), p. 185-193, 1993.

MARTIN, C.; TIMM, J.; RAUZIER, J.; GOMEZ-LUS, R.; DAVIES, J.; GICQUEL, B. Transposition of an antibiotic resistant element in mycobacteria. **Nature.** v. 345, p. 739-743, 1990.

MAAS, J.J.; FOUORAINE, N.A.; SCHELLEKENS, P.T.; MENSEN, M.E.; VEENSTRA, J.; ROOS, M.T.; VAN LEEUWEN, R.; COUTINHO, R.A. Reliability of tuberculin purified derivative skin testing and delayed-type hypersensitivity skin test anergy in HIV-infected homosexual men, at risk of tuberculosis. **AIDS.** v. 13(13), p. 1784-1785, 1999.

MASUR, H.; MICHELIS, M.A.; GREENE, J.B.; ONORATO, I.; STOUWE, R.A.; HOLZMAN, R.S.; WORMSER, G.; BRETTMAN, L.; LANGE, M.; MURRAY, H.W.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: Initial manifestations of cellular immune dysfunction. **N Engl J Med.** v. 305, p. 1431, 1981.

MEANS, T.K.; WANG, S.; LIEN, E.; YOSHIMURA, A.; GOLENBOCK, D.T.; FENTON, M.J. Human Toll-Like Receptors Mediate Cellular Activation by *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol.** v. 163, p. 3920-3927, 1999.

MELLORS, J.W.; MUÑOZ, A.; GIORGI, J.V.; MARGOLICK, J.B.; TASSONI, C.J.; GUPTA, P.; KINGSLEY, L.A.; TODD, J.A.; SAAH, A.J.; DETELS, R.; PHAIR, J.P.; RINALDO, C.R. JR. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-infection. **Ann Intern Med.** v. 126, p. 946-954, 1997.

MELLORS, J.W.; RINALDO, C.R. JR.; GUPTA, P.; WHITE, R.M.; TODD, J.A.; KINGSLEY, L.A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science**. v. 272, p. 1167-1170, 1996.

MILLER, M.; THIBERT, L.; DESJARDINS, F.; SIDDIQI, S.; DASCAL, A. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide: comparison of Bactec method with pyrazinamidase assay. **J Clin Microbiol**. v. 33, p. 2468-2470, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico - Aids e DST 2006**. Brasília, Brasil. nov. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia do Programa de Vigilância Epidemiológica da tuberculose multirresistente (Versão Preliminar)**. Rio de Janeiro. Brasil, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças**. Brasília. Brasil. 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Portaria n.º 59/GM**. Brasília. Brasil. Em 28 de janeiro de 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Políticas de Saúde. **Manual Técnico para o Controle da Tuberculose: cadernos de atenção básica**. Brasília. Brasil. 2002a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5. ed. – Rio de Janeiro. Brasil. 2002b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Fundação Nacional de Saúde. **Tuberculose - Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília. Brasil. 2002c.

MORENO, S.; MIRALLES, P.; DIAZ, M.D.; BARAIA, J.; PADILLA, B.; BERENGUER, J.; ALBERDI, J.C. Isoniazid preventive therapy in human immunodeficiency virus infected persons. Long-term effect on development of tuberculosis and survival. **Arch Intern Med**. v. 157(15), p. 1729–1734, 1997.

MORENO, S.; BARAIA-ETXABURU, J.; MIRALLES, P.; BERENGUER, J.; COSIN, J.; BERNALDO DE QUIROS, J.C. Tuberculin reaction size in patients infected with HIV. **AIDS**. v. 9(11), p. 1289-1290, 1995.

MORENO S, BARAIA-ETXABURU, J.; BOUZA, E.; PARRAS, F.; PÉREZ-TASCÓN, M.; MIRALLES, P.; VICENTE, T.; ALBERDI, J.C.; COSÍN, J.; LÓPEZ-GAY, D. Risk for developing tuberculosis among anergic patients infected with HIV. **Ann Intern Med**. v. 119(3), p. 194-198, 1993.

MURCIA-ARANGUREN, M.I.; GOMEZ-MARIN, J.E.; ALVARADO, F.S.; BUSTILLO, J.G.; DE MENDIVRLSON, E.; GOMEZ, B.; LEON, C.I.; TRIANA, W.A.; VARGAS, E.A.; RODRIGUEZ, E. Frequency of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in HIV infected patients from Bogota, Colombia. **BMC Infect Dis**. v. 1, p. U1-U7, 2001.

MURRAY, J.; SONNENBERG, P.; SHEARER, S.C.; GODFREY-FAUSSETT, P. Human Immunodeficiency Virus and the Outcome of Treatment for New and Recurrent Pulmonary Tuberculosis in African Patients. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 159, p. 733–740, 1999

MURRAY, C.J.L.; STYBLO, K.; ROUILLON, A. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. **Bull Int Union Tuberc Lung Dis** v. 65, p. 6– 24, 1990.

NAKATA, K.; ROM, W.N.; HONDA, Y.; CONDOS, R.; KANEGASAKI, S.; CAO, Y.; WEIDEN, M. *Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 155, p. 996-1003, 1997.

NARAIN, J.P.; LO, Y.R. Epidemiology of HIV-TB in Asia. **Indian J Med Res.** v. 120, p. 277-289, 2004.

NOESKE, J.; NGUENKO, P.N. Impact of resistance to anti-tuberculosis drugs on treatment outcome using World Health Organization standard regimens. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 96, p. 429-433, 2002.

NUNN, P.; WILLIAMS, B.; FLOYD, K.; DYE, C.; ELZINGA, G.; RAVIGLIONE, M. Tuberculosis control in the era of HIV. **Nat Rev Immunol.** v. 5, p. 819-826, 2006.

O'GARRA, A.; ARAI, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. **Trends Cell Biol.** v. 10, p. 542-555, 2000.

PADMAPRIYADARSINI, C.; SWAMINATHAN, S. Preventive therapy for tuberculosis in HIV infected individuals. **Indian J Med Res.** v. 121, p. 415-423, 2005.

PARK, H.; JANG, H.; KIM, C.; CHUNG, B.; CHANG, C.L.; PARK, S.K.; SONG, S. Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus- and species-specific PCR primers. **J Clin Microbiol.** v. 38, p. 4080-4085, 2000.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K.D.; THOMSON, N.R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K.L.; BENTLEY, S.D.; HOLDEN, M.T.G.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R.M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T.T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T.S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; Ó'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.;

RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, K.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18 p848. **Nature**. v. 413, p. 848-852, 2001.

PARRY, C.M.; KAMOTO, O.; HARRIES, A.D.; WIRIMA, J.J.; NYIRENDA, C.M.; NYANGULU, D.S.; HART, C.A. The use of sputum induction for establishing a diagnosis in patients with suspected pulmonary tuberculosis in Malawi. **Tubercle Lung Dis**. v. 76, p. 72–76, 1995.

PEDERSEN, C.; LINDHARDT, B.O.; JENSEN, B.L.; LAURITZEN, E.; GERSTOFT, J.; DICKMEISS, E.; GAUB, J.; SCHEIBEL, E.; KARLSMARK, T. Clinical course of primary HIV infection: Consequences for subsequent course of infection. **BMJ**. v. 29, p. 154-157, 1989.

PEDRO-BOTET, J.; GUTIÉRREZ, J.; MIRALLES, R.; COLL, J.; RUBIÉS-PRAT, J. Pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients with normal chest radiographs. **AIDS**. v. 6, p. 91–93, 1992.

PELOQUIN, C.; MACPHEE, A.A.; BERNING, S.E. Malabsorption of antimycobacteria medications (Letter). **N Engl J Med**. v. 329, p. 1122-1123, 1993.

PERLMAN, D.C.; EL-SADR, W.M.; NELSON, E.T.; MATTS, J.P.; TELZAK, E.E.; SALOMON, N.; CHIRGWIN, K.; HAFNER, R. Variation of chest radiographic patterns in pulmonary tuberculosis by degree of human immunodeficiency virus-related immunosuppression: the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS (CPCRA). **Clin Infect Dis**. v. 25, p. 242- 246, 1997.

PFYFFER, G.E.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; WALLACE JUNIOR, R.J. *Mycobacterium*: General characteristics, Isolation and Straining Procedures. In MURRAY PR, BARON EJ, JORGENSEN JH, PFALLER MA, YOLKEN RH (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM press. 2003. 8ª edição, p. 532-559.

PIETERS, J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. **Microbes Infect.** v. 3, p. 249-255, 2001.

PINHO, A.M.; SANTORO-LOPES, G.; HARRISON, L.H.; SCHECHTER, M. Chemoprophylaxis for tuberculosis and survival of HIV-infected patients in Brazil. **AIDS.** v. 15(16), p. 2129–2135, 2001.

POPOVIC, M.; SARNGADHARAN, M.G.; READ, E.; GALLO, R.C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science.** v. 224, p. 497-500, 1984.

QUESNIAUX, V.J.; NICOLLE, D.M.; TORRES, D.; KREMER, L.; GUERARDEL, Y.; NIGOU, J.; PUZO, G.; ERARD, F.; RYFFEL, B. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans, **J Immunol.** v. 172, p. 4425-4434, 2004.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tuber Lung Dis.** v. 79, p. 3-29, 1998.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.** v. 20(1), p. 21-54, 2001.

RAVIGLIONE, M.C.; LUELMO, F. Update on the global epidemiology of tuberculosis. **Curr Issues Public Health.** V. 2, p.192– 197, 1996.

RAVIGLIONE, M.C.; SNIDER, D.; KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA.** v. 273(3), p. 220–226, 1995.

RAVIGLIONE, M.C.; SUDRE, P.; RIEDER, H.L.; SPINACI, S.; KOCHI, A. Secular trends of tuberculosis in Western Europe. **Bull World Health Organ.** v. 71, P. 297– 306, 1993.

REILING, N.; HÖLSCHER, C.; FEHRENBACH, A.; KROGER, S.; KIRSCHNING, C.J.; GOYERT, S.; EHLERS, S. Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol.** v. 169, p. 3480-3484, 2002.

RIEDER, H.L.; ZELLWEGER, J.P.; RAVIGLIONE, M.C.; KEIZER, S.T.; MIGLIORI, G.B. Tuberculosis control in Europe and international migration. Report of European Task Force. **Eur Respir J.** v. 7, p.1545– 1553, 1994.

RIEDER, H.L.; CAUTHEN, G.M.; BLOCH, A.B. Tuberculosis and the acquired immunodeficiency syndrome – Flórida. **Arch Intern Med.** v. 149(6), p. 1268-1273, 1989.

RILEY, L.W.; Drug-resistant tuberculosis. **Clin Infect Dis.** v. 17, p. 442-446, 1993.

RINGUET, H.; AKOUA-KOFFI, C.; HONORE, S.; VARNEROT, A.; VINCENT, V.; BERCHE, P.; GAILLARD, J.L.; PIERRE-AUDIGIER, C. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. **J Clin Microbiol.** v. 37, p. 852-857, 1999.

ROGALL, T.; FLOHR, T.; BOTTGER, E.C. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. **J Gen Microbiol.** v. 136(Pt 9), p. 1915-1920, 1990.

ROUILLON, A.; PERDRIZET, S.; PARROT, R. Transmission of tubercle bacilli: the effects of chemotherapy. **Tubercle.** v. 57, p. 275–299, 1976.

RUTHERFORD, G.W.; LIFSON, A.R.; HESSOL, N.A.; DARROW, W.W.; O'MALLEY, P.M.; BUCHBINDER, S.P.; BARNHART, J.L.; BODECKER, T.W.; CANNON, L.; DOLL, L.S.

Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men: An 11-year follow-up study. **BMJ**, v. 301, p. 1183-1188, 1990.

SAAD, M.H.F.; VINCENT, V.; DAWSON, D.; PALACI, M.; FERRAZOLI, L.; FONSECA, L.S. Analysis of *Mycobacterium avium* complex serovars isolated from AIDS patients from Southeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 92, p. 471-475, 1997.

SAAG, M.S.; HOLODNIY, M.; KURITZKES, D.R.; O'BRIEN, W.A.; COOMBS, R.; POSCHER, M.E.; JACOBSEN, D.M.; SHAW, G.M.; RICHMAN, D.D.; VOLBERDING, P.A. HIV viral load markers in clinical practice. **Nat Med**. v. 2, p. 625-629, 1996.

SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Curr Opin Immunol**. v. 17, p. 374-380, 2005.

SARNGADHARAN, M.G.; POPOVIC, M.; BRUCH, L.; SCHUPBACH, J.; GALLO, R.C. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. **Science** v. 224, p. 506-508, 1984.

SCHACKER, T.; COLLIER, A.C.; HUGHES, J.; SHEA, T.; COREY, L. Clinical and epidemiological features of primary HIV infection. **Ann Intern Med**. v. 125, p. 257-264, 1996.

SCHLUGER, N.W. The Pathogenesis of Tuberculosis - The First One Hundred (and Twenty-Three) Years. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v. 32, p. 251-256, 2005.

SCHÜPBACH, J. Human Immunodeficiency Viruses. In MURRAY PR, BARON EJ, JORGENSEN JH, PFALLER MA, YOLKEN RH (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM press. 2003. 8ª edição, p. 1253-1281.

SCHÜPBACH, J.; POPOVIC, M.; GILDEN, R.V.; GONDA, M.A.; SARNGADHARAN, M.G.; GALLO, R.C. Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. **Science**. v. 224, p. 503-505, 1984.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ (SESA). **Informe Epidemiológico: Tuberculose**. Fortaleza. 2006.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ (SESA). **Boletim Epidemiológico DST/Aids**. Fortaleza. 2006.

SELWYN, P.A.; HARTEL, D.; LEWIS, V.A.; SCHOENBAUM, E.E.; VERMUND, S.H.; KLEIN, R.S.; WALKER, A.T.; FRIEDLAND, G.H. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med**. v. 320, p. 545-550, 1989.

SHAFER, R.W.; EDLIN, B.R. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. **Clin Infect Dis**. v. 22(4), p. 683-704, 1996.

SHAFER, R.W.; CHIRGWIN, K.D.; GLATT, A.E.; DAHDOUH, M.A.; LANDESMAN, S.H.; SUSTER, B. HIV prevalence, immunosuppression, and drug resistance in patients with tuberculosis in an area endemic for AIDS. **AIDS**. v. 5, p. 399-405, 1991.

SHARMA, S.K.; MOHAN, A.; KADHIRAVAN, T. HIV-TB co-infection: Epidemiology, diagnosis & management. **Indian J Med Res**. v. 121p. 550-567, 2005.

SHARMA, S.K.; MOHAN, A. Multidrug-resistant tuberculosis. **Indian J Med Res**. v. 120, p. 354 -376, 2004a.

SHARMA, S.K.; MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. **Indian J Med Res.** v. 120, p. 316-353, 2004b.

SHARMA, S.K.; KADHIRAVAN, T.; BANGA, A.; GOYAL, T.; BHATIA, I.; SAHA, P.K. Spectrum of clinical disease in a cohort of 135 hospitalised HIV-infected patients from north India. **BMC Infect Dis.** v. 4, p. 52, 2004c.

SHARMA, S.K.; TURAGA, K.K.; BALAMURUGAN, A.; SAHA, P.K.; PANDEY, R.M.; JAIN, N.K.; KATOCH, V.M.; MEHRA, N.K. Clinical and genetic risk factors for the development of multidrug-resistant tuberculosis in non-HIV infected at a tertiary care center in India: a case-control study. **Infect Genet Evol.** v. 3, p. 183-188, 2003.

SHARMA, S.K.; GULERIA, R.; JAIN, D.; CHAWLA, T.C.; SAHA, P.; MOHAN, A.; JAIN, N.K. Effect of additional oral ofloxacin administration in the treatment of multi-drug resistant tuberculosis. **Indian J Chest Dis Allied Sci.** v. 38, p. 73-79, 1996.

SINGH, S.P.; MEHRA, N.K.; DINGLEY, H.B.; PANDE, J.N.; VAIDYA, M.C. Human leukocyte antigen (HLA)-linked control of susceptibility to tuberculosis and association with HLA-DR types. **J Infect Dis.** v. 148(4), p. 676-681, 1983.

SILVEIRA, J.M.; SASSI, R.A.M.; NETTO, I.C.O.; HETZEL, J.L. Prevalence of and factors related to tuberculosis seropositive human immunodeficiency virus patients at a reference center for treatment of human immunodeficiency virus in the southern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **J Bras Pneumol.** v. 32(1), p.48-55, 2006.

SMALL, P.M.; HOPEWELL, P.C.; SINGH, S.P.; PAZ, A.; PARSONNET, J.; RUSTON, D.C.; SCHECTER, G.F.; DALEY, C.L.; SCHOOLNIK, G.K. The Epidemiology of Tuberculosis in San Francisco -- A Population-Based Study Using Conventional and Molecular Methods. **N Engl J Med.** v. 330, p. 1703-1709, 1994.

SMALL, P.M.; HOPEWELL, P.C.; SCHECTER, G.F.; CHAISSON, R.E.; GOODMAN, P.C. Evolution of chest radiographs in treated patients with pulmonary tuberculosis and HIV infection. **J Thorac Imaging**. v. 9, p. 74–77, 1994.

SONNENBERG, P.; GLYNN, J.R.; FIELDING, K.; MURRAY, J.; GODFREY-FAUSSETT, P.; SHEARER, S. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. **J Infect Dis**. v. 191, p.150-158, 2005.

SOUZA, M.B.; ANTUNES, C.M.F.; GARCIA, G.F. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* at a referral center for infectious diseases in the state of Minas Gerais, Brazil: sensitivity profile and related risk factors. **J Bras Pneumol**. v. 32(5), p. 430-437, 2006a.

SOUZA, L.R.; GALVÃO, M.T.G.; MACHADO, J.M.; MEIRA, D.A.; CUNHA, K. Tuberculin testing of individuals infected with the human immunodeficiency virus: relationship with peripheral T-cell counts and active tuberculosis. **J Bras Pneumol**. v. 32(5), p. 438-443, 2006b.

SPENCE, D.S.; HOTCHKISS, J.; WILLIAMS, C.S.D.; DAVIES, P.D.O. Tuberculosis and poverty. **Br Med J**. v. 307, p. 759–761, 1993.

STEIN, O.S.; KORVICK, J.A.; VERMUND, S.H. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: A review. **J Infect Dis**. v. 165, p. 352-363, 1992.

STENGER, S.; MODLIN, R.L. Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. **Curr Opin Immunol**. v. 14, p. 452-457, 2002.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P.H.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P.L.; COLLINS, H.L.; FOK, A.K.; ALLEN, R.D.; GLUCK, S.L.; HEUSER, J.; RUSSELL, D.G. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**. v. 263, P. 678-681, 1994.

STYBLO, K. Recent advances in epidemiological research in tuberculosis. **Adv Tuberc Res.** v. 20, p. 1-63, 1980.

TAKEWAKI, S.I.; OKUZUMI, K.; MANABE, I.; TANIMURA, M.; MIYAMURA, K.; NAKAHARA, K.; YAZAKI, Y.; OHKUBO, A.; NAGAI, R. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR- restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. **Int J Syst Bacteriol.** v. 44, p. 159-166, 1994.

TAN, J.S.; CANADAY, D.H.; BOOM, W.H.; BALAJI, K.N.; SCHWANDER, S.K.; RICH, E.A. Human alveolar T lymphocyte responses to *M. tuberculosis* antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. **J Immunol.** v. 159, p. 290-297, 1997.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; LOWRIE, D.; COLE, S.T.; COLSTON, M.J.; MATTER, L.; SCHOPFER, K.; BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet.** v. 341, p. 647-650, 1993a.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖOTGER, E.C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J Clin Microbiol.** v. 31, p. 175-178, 1993b.

TELZAK, E.E.; CHIRGWIN, K.D.; NELSON, E.T.; MATTS, J.P.; SEPKOWITZ, K.A.; BENSON, C.A.; PERLMAN, D.C.; EL-SADR, W.M. Predictors for multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected patients and response to specific drug regimens. Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS (CPCRA) and the AIDS Clinical Trials Group (ACTG), National Institutes for Health. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 3, p. 337-343, 1999.

THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; TAKEUCHI, O.; OCHOA, M.T.; ENGELE, M.; SIELING, P.A.; BARNES, P.F.; ROLLINGHOFF, M.; BOLCSKEI, P.L.; WAGNER, M.; AKIRA, S.; NORGDARD, M.V.; BELISLE, J.T.; GODOWSKI, P.J.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors, **Science**. v. 291, p. 1544-1547, 2001.

TINDALL, B.; COOPER, D.A. Primary HIV infection: Host responses and intervention strategies. **AIDS**. v. 5, p. 1-14, 1991

TJÄRNLUND, A.; GUIRADO, E.; JULÍAN, E.; CARDONA, P.F.; FERNÁNDEZ, C. Determinant role for Toll-like receptor signalling in acute mycobacterial infection in the respiratory tract. **Microbes Infect.** v. 8, p. 1790-1800, 2006.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clin Microbiol Rev.** v. 16, p. 319–354, 2003.

TOOSSI, Z.; NICOLACAKIS, K.; XIA, L.; FERRARI, N.A.; RICH, E.A. Activation of latent HIV-1 by *Mycobacterium tuberculosis* and its purified protein derivative in alveolar macrophages from HIV-infected individuals in vitro. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** v. 15, p. 325-331, 1997.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A.; SMITH, K.D.; ADEREM, A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **PNAS.** v. 96, p. 14459-14463, 1999.

VAN EMBDEN, J.D.; VAN GORKOM, T.; KREMER, K.; JANSEN, R.; VAN DER ZEIJST, B.A.; SCHOULS, L.M. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **J Bacteriol.** v. 182, p. 2393-2401, 2000.

VAN DER WERF, M.J.; YEGOROVA, O.B.; CHENTSOVA, N.; CHECHULIN, Y.; HASKER, E.; PETRENKO, V.I.; VEEN, J.; TURCHENKO, L.V. Tuberculosis-HIV Co-infection in Kiev City, Ukraine. **Emerg Infect Dis.** v. 12(5), p. 766-768, 2006

VAN SOOLINGER, D.; VAN DER ZANDEN, A.G.M.; DE HAAS, P.E.W.; NOORDHOEK, G.T.; KIERS, A.; FOUORAINE, N.A.; PORTAELS, F.; KOLK, H.J.; KREMER, K.; VAN EMBDEN, J.D.A. Diagnosis of *Micobacterium microti* infections amongs humans by using novel genetic markers. **J Clin Microbiol.** v. 36, p.1840-1845, 1998.

VANACORE, P.; KOEHLER, B.; CARBONARA, S.; ZACCHINI, F.; BASSETTI, D.; ANTONUCCI, G.; IPPOLITO, G.; GIRARDI, E.; THE GISTA-SIMIT STUDY GROUP. Drug-Resistant Tuberculosis in HIV-Infected Persons: Italy 1999–2000. **Infection.** v. 32, p. 328–332, 2004.

VIA, L.; DERETIC, D.; ULMER, R.J.; HIBLER, N.S.; HUBER, L.A.; DERETIC, V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by *rab5* and *rab7*. **J BiolChem.** v. 272, p.13326–13331, 1997.

VINCENT, V.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; JOST, K.C.; WALLACE, R.J. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification. In MURRAY PR, BARON EJ, JORGENSEN JH, PFALLER MA, YOLKEN RH. **Manual of Clinical Microbiology.** Washington, DC: ASM press. 2003. 8<sup>a</sup> edição, p. 560-584.

VON REYN, C.F.; ARBEIT, R.D.; TOSTESON, A.N.A.; RISTOLA, M.A.; BARBER, T.W.; WADDELL, R.; SOX, C.H.; BRINDLE, R.J.; GILKS, C.F.; RANKI, A.; BARTHOLOMEW, C.; EDWARDS, J.; FALKINHAM III, J.O.; O'CONNOR, G.T.; THE INTERNATIONAL MAC STUDY GROUPET. The international epidemiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. **AIDS.** v. 10, p. 1025–1032, 1996.

WALLACE, R.J.J.; GRIFFITH, D.E. Antimycobacterial agents. . In MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R. (Ed.). **Principles and Practice of Infectious Disease**. 6ª edição. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2005. cap. 36, p. 489-501.

WATANABE, A.; RUFFINO-NETTO, A. O perfil epidemiológico dos casos de tuberculose notificados em hospital terciário. Ribeirão Preto - São Paulo. **Boletim de Pneumologia Sanitária**. v. 9(1), p. 19-34, 2001.

WAYNE, L.Ga.G.P.K. The mycobacteria. In SNEATH NSMPHA, SHARPE ME, HOLT JG. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Md: The Williams and Wilkins. 1986. p.1435-1457.

WEISS, R.A.; MCMICHAEL, A.J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. **Nat Med**. v. 10(12), p. 70-76, 2004.

WIGG, M.D. Vírus da Imunodeficiência Humana. In SANTOS NOS, ROMANOS MTV, WIGG MD. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002, p. 183-198.

WILLIAMS, B.G.; DYE, C. Antiretroviral Drugs for Tuberculosis Control in the Era of HIV/AIDS. **Science**. v. 301, p. 1535-37, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. **WHO report 2006**. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2006.362), 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Gender in Tuberculosis Research**. WHO, Geneva, 2004a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **TB/HIV – A Clinical manual**. WHO, Geneva, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the Third Global TB/HIV Working Group meeting: 'Two diseases: one patient'**. WHO, Geneva, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis Control. **World Health Organ Tech Rep Ser.** 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **47th World Health Assembly: provisional agenda item 19.** Tuberculosis programme - Progress report by the Director-General. Documento WHA47/1994/A47/12. Geneva (Suíça): World Health Organization; 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO declares tuberculosis a global emergency** [press release]. Geneva (Suíça): World Health Organization; April 23, 1993.

ZHANG, Y.; GARBE, T.; YOUNG, D. Transformation with *katG* restores isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. **Mol Microbiol.** v. 8, p.521-524, 1993.

ZOLG, J.W.; PHILIPPI-SCHULZ, S. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. **J Clin Microbiol.** v. 32, p. 2801-2812, 1994.

ZUMLA, A.; MALON, P.; HENDERSON, J.; GRANGE, J.M. Impact of HIV infection on tuberculosis. **Postgrad Med J.** v. 76, p. 259-268, 2000.

## **ANEXOS**

## Anexo A - Instrumento de investigação epidemiológica



ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E PERFIL DE SENSIBILIDADE A DROGAS  
ANTI-TUBERCULOSE EM PACIENTES CO-INFECTADOS COM  
MICOBACTÉRIAS/HIV EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM  
FORTALEZA, BRASIL.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA  
Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina

Universidade Federal do Ceará

Registro Pesquisa: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Data de coleta das informações: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

### Identificação

1. Nome: \_\_\_\_\_ 2. Idade: \_\_\_\_\_  
3. Prontuário: \_\_\_\_\_ 4. Unidade de Atendimento: (HSJ) Outra: \_\_\_\_\_  
5. Sexo: (Masculino), (Feminino)  
6. Endereço: \_\_\_\_\_ 7. Bairro: \_\_\_\_\_  
8. Fone: \_\_\_\_\_  
9. Estado Civil: (Casado), (Divorciado), (Separado), (Menor), (Solteiro), (Viúvo), (Ignorado).  
10. Profissão: \_\_\_\_\_ 11. Procedência: \_\_\_\_\_  
12. Naturalidade: \_\_\_\_\_

### Dados Sócio – Econômicos

13. Estudou até que série? \_\_\_\_\_ Analfabeto ( )  
14. Renda Familiar em salários mínimos: \_\_\_\_\_  
15. N°. de pessoas na casa: \_\_\_\_ Adultos: \_\_\_\_ Crianças: \_\_\_\_

### Manifestações Clínicas do HIV

16. Principais Complicações Definidoras de aids – Categoria C (CDC, 1993) + data do diagnóstico ( ):

1. Criptococose (extra-pulmonar)
2. Toxoplasmose em SNC
3. Tuberculose (qualquer sítio)
4. Micobacteriose NT (MAC ou M. kansasii) disseminada ou extra-pulmonar
5. CMV retinite
6. CMV doença (exceto em fígado, baço ou linfonodos)
7. Complexo Demência- aids
8. Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva
9. PN por P. carinii
10. PN recorrente
11. Síndrome Consumptiva (Wasting Sd.)
12. Criptosporidiose intestinal crônica (> 1 mês de duração)
13. Isosporíase intestinal crônica (> 1 mês de duração)
14. Histoplasmosose (disseminada ou extrapulmonar).
15. Candidíase esofágica
16. Candidíase respiratória (brônquio, traquéia ou pulmões)
17. Septicemia por Salmonella (recorrente)
18. CA de colo uterino (invasivo)
19. Herpes doença (úlceras crônicas c/ > 1 mês; ou bronquite, pneumonia ou esofagite)
20. Sarcoma de Kaposi
21. Linfoma de Burkitt
22. Linfoma primário do SNC
23. Coccidiodomicose (disseminada ou extrapulmonar)



<b>Log</b>						
------------	--	--	--	--	--	--

**Tratamento**

25. Está sendo tratado para HIV? (Sim) (Não)

26. Início do tratamento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

27. Esquema do tratamento p/ HIV:

<b>Data</b>						
<b>Drogas</b>						

26. Duração do tratamento p/ HIV: \_\_\_ meses

27. Tratamento interrompido? (Sim), (Não)

28. Vem recebendo algum medicamento regularmente? (Sim), (Não) Quais? \_\_\_\_\_

29. Tratamento profilático contra tuberculose? (Sim), (Não)

Qual? \_\_\_\_\_

**DADOS SOBRE A MICOBACTERIOSE:****30. Condições Associadas**

Alcoolismo ( )

UD ( )

Diabetes ( )

Doença Psiquiátrica ( )

Indigência ( )

Desnutrição ( )

Outras: \_\_\_\_\_

**MICOBACTERIOSE TUBERCULOSA (MT)**

31. Data do diagnóstico: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

32. Caso novo ( ) Retratamento ( ) (Pós-abandono) (Recidiva<5a) (Recidiva>5a) (Falha)

33. Diagnóstico: Confirmado ( ) Presuntivo ( )

Baciloscopia ( ) PPD ( )

Rx de tórax ( ) Histopatológico ( )

**Cultura( ) Material:** \_\_\_\_\_

**34. Forma Clínica:** Pulmonar ( ) Extra-pulmonar ( )

1. Ganglionar

2. Pleural

3. Laríngea

4. Renal

5. Meníngea/Cerebral

6. Óssea

7. Miliar

8. Outra: \_\_\_\_\_

**MICOBACTERIOSE NÃO-TUBERCULOSA (MNT)**

**35. Data do diagnóstico:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**36. Forma Clínica:**

\_\_\_\_\_

**37. Diagnóstico:** Confirmado ( ) Presuntivo ( ) Baciloscopia ( )

PPD ( )

Rx de tórax ( )

Histopatológico ( )

Cultura( ) Material: \_\_\_\_\_

Outro: \_\_\_\_\_

**38. Antibiograma:**

**39. Tratamento Atual:** Data do início: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Previsão de término: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data				
Drogas				

Reações adversas:

\_\_\_\_\_

Tratamentos anteriores:

\_\_\_\_\_

**40. Baciloscopias**

	Diagnóstico											Após tto.
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>o</sup> mês	2 <sup>o</sup> mês	3 <sup>o</sup> mês	4 <sup>o</sup> mês	5 <sup>o</sup> mês	6 <sup>o</sup> mês	7 <sup>o</sup> mês	8 <sup>o</sup> mês	9 <sup>o</sup> mês	
Mês												
Data												
Resultado												

**41. Desfecho**

Alta médica ( )

Alta por completar tratamento ( )

Alta por mudança de diagnóstico ( )

Alta por abandono ( )

Alta por falência ( )

Alta por transferência ( )

Óbito ( )

## Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética do Hospital São José



### HOSPITAL SÃO JOSÉ

Rua Nestor Barbosa, 315 - Parcelândia. Fortaleza/Ce.  
 CEP 60.455-610. PABX (85) 3101-2352. FAX (85) 3101-2319  
 CGC 07.954.571/0035 - 53. CGF 06951047-4.

#### PARECER PROJETO DE PESQUISA

Referente: Protocolo nº 034/2005

Interessado: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

Instituições envolvidas: Departamento de Patologia e Medicina Legal - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Ceará (UFC).  
 Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) - Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA).

Título do Projeto: "Estudo epidemiológico e perfil de sensibilidade à drogas anti-tuberculose em pacientes co-infectados com Micobactéria/HIV em hospital de referência em Fortaleza, Brasil".

Analizamos o referido projeto nas reuniões ordinárias deste comitê, nos dias 21 de novembro de 2005 e 13 de fevereiro de 2006. Trata-se de um estudo retrospectivo, onde serão analisados os casos de co-infecção micobactérias e HIV, de pacientes assistidos no Hospital São José, no período de julho de 2003 a julho de 2006, procurando correlacionar dados clínicos obtidos, a partir de informações de prontuários, com aspectos microbiológicos de sensibilidade dos isolados e identificação molecular dessas cepas. O estudo é de grande relevância. O material é bem apresentado, houve uma excelente revisão bibliográfica e os pesquisadores têm experiência com o assunto.

A metodologia está convenientemente desenhada para os objetivos propostos, com critérios claros de inclusão e exclusão. Uma análise estatística está prevista. O instrumento para coleta dos dados de prontuário médico está adequado. Assim como foi apresentado documentos que isentam a instituição de ônus financeiros com o estudo, assim como um cronograma plausível de execução.

Todas as pendências apontadas no Parecer Consubstanciado anterior, datado de 24 de novembro de 2005, foram atendidas.

Por esses aspectos, o protocolo foi considerado **APROVADO** na reunião do dia 13 de fevereiro de 2006.

Lembramos a necessidade de envio de relatório semestral do andamento do projeto e de relatório final quando de sua conclusão, além de que qualquer mudança nas propostas do estudo, deverá passar por uma prévia avaliação deste comitê.

Fortaleza, 01 de março de 2006.

Érico Arruda.

Coordenador do CEP/HSJ.

## Anexo C - Soluções e reagentes

### CABOLFUCSINA

Fucsina básica	1,0g
Álcool etílico a 95%	10mL
Fenol	5 mL
Água destilada	95 mL

Dissolver a fucsina básica em álcool e em seguida dissolver o fenol em água. Misturar as duas soluções. Deixar em banho-maria à 37°C durante uma noite. Filtrar o corante uma vez por semana após agitação rigorosa.

### ÁLCOOL-ÁCIDO

Álcool etílico a 95%	97 mL
Ácido clorídrico	3 mL

### SOLUÇÃO CONTRASTE

Azul de metileno	0,3g
Água destilada	100 mL

### TAE 50 X (Tris-acetato-EDTA)

Tris base	242g
EDTA	18,612g
Água destilada	500 mL

Dissolva 242g de Tris base, 18,612g de EDTA em 500ml de água destilada. Ajuste o pH para 8,0 com ácido acético glacial ( $\approx 57,1$ ml). Complete o volume para 1L com água. Depois autoclavar.

**TBE 5X (Tris-borato-EDTA)**

Tris base	54g
EDTA 0,5M (pH 8,0)	20 mL
Água destilada	500 mL

Dissolva 54g de Tris base, em 500ml de água destilada. Adicione 20 ml de EDTA 0,5M (pH 8,0). Ajuste o pH para 7,5-7,8 com ácido bórico ( $\approx 27,5$  g). Complete o volume para 1L com água. Depois autoclavar.

**PBS (*Phosphate-buffered saline*)**

NaCl	8g
KCl	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24g
Água destilada	800 mL

Dissolver 8g de NaCl; 0,2g de KCl; 1,44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,24g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 800 ml de água destilada. Ajustar o pH para 7,4 com HCl. Adicionar água para 1L. Depois autoclavar.

**PRIMER Tb 11: 5' – ACCAACGATGGTGTGTCCAT -3'**

Tamanho do iniciador: 20pb

Nmoles: 34,7

Concentração estoque: 34,7 $\mu$ M

Concentração de trabalho: 5 $\mu$ M

O iniciador liofilizado foi diluído em 1mL de água milli-Q para obtenção da solução estoque. A solução de trabalho foi obtida pela mistura de 14,41 $\mu$ L da solução estoque com 85,59 $\mu$ L de água milli-Q para um volume final de 100 $\mu$ L. As soluções foram estocadas a -20°C.

**PRIMER Tb 12: 5' – CTTGTCTGAACCGCATACCCT – 3'**

Tamanho do iniciador: 20pb

Nmoles: 40,1

Concentração estoque: 40,1 $\mu$ M

Concentração de trabalho: 5 $\mu$ M

O iniciador liofilizado foi diluído em 1mL de água milli-Q para obtenção da solução estoque. A solução de trabalho foi obtida pela mistura de 12,47 $\mu$ L da solução estoque com 87,53 $\mu$ L de água milli-Q para um volume final de 100 $\mu$ L. As soluções foram estocadas a -20°C.

**BROMETO DE ETÍDIO (10mg/mL)(VETEC)**

Brometo de etídio	1g
Água destilada	100 mL

Usar máscara durante a pesagem do brometo. Agitar a mistura com o auxílio de um agitador magnético por algumas horas para assegurar que o corante dissolva. Distribuir em alíquotas e envolver os frascos em papel alumínio, ou manter o material armazenado em garrafa de cor âmbar. Estocar a temperatura ambiente.

**TAMPÃO DE CARREGAMENTO (*Loading Buffer*) 6X**

Azul de bromofenol	242g
EDTA	18,612g
Água destilada	500mL

Homogeneizar e armazenar a 4°C.

**GEL DE MS8 AGAROSE 4,5% (BIOAMERICA)**

MS8 Agarose	6,75g
TAE 1X	150 mL

Colocar o TAE frio em um recipiente 2 a 4 vezes maior que o volume do gel. Diluir a agarose vagorosamente, agitando constante com o auxílio de um agitador magnético. Deixar a

agarose re-hidratar durante 15 minutos. Pesar a solução antes de aquecer. Aquecer em forno microondas até diluição completa da solução. Retornar o frasco ao peso original adicionando água destilada morna. Misture gentilmente até esfriar a uma temperatura de 50-60° C. Adicionar 7,5µL de brometo de etídio. Aplicar o gel na cuba e aguardar solidificar por 30 minutos. Deixar o gel na geladeira a uma temperatura de 4°C por 30 minutos.

**MARCADORES 25 e 50 pb (PROMEGA)**

Marcador (solução estoque)                      50 µL

Blue/orange Loading Buffer 6X                      10 µL

Homogeneizar a mistura em vortex e estocar a -20°C. Aplicar 6µL da solução em cada poço do gel para eletroforese.

**Anexo D - 1993 Sistema de classificação da infecção pelo HIV (CDC, 1992):**

## Critérios Imunológicos:

- Categoria 1: maior ou igual a 500 células/ $\mu$ L.
- Categoria 2: 200-499 células/ $\mu$ L.
- Categoria 3: menor que 200 células/ $\mu$ L.

## Critérios Clínicos:

## Categoria A:

A Categoria A consiste de uma ou mais das condições listadas abaixo em uma adolescente ou adulto (idade maior ou igual a 13 anos) com documentada infecção pelo HIV. As condições listadas nas categorias B e C não podem ocorrer.

- Infecção pelo HIV assintomática.
- Linfadenopatia generalizada persistente.
- Infecção aguda pelo HIV.

## Categoria B:

A Categoria B consiste de condições sintomáticas em uma adulto ou adolescente infectado pelo HIV que não estão incluídas dentre as listadas na categoria C e que preenchem pelo menos um dos seguintes critérios: a) as condições são atribuídas à infecção pelo HIV ou são indicativas de deficiência na imunidade celular; ou b) as condições são consideradas pelos médicos como tendo um curso clínico ou requer manejo que é complicado pela infecção pelo HIV. Exemplos dessas condições na categoria clínica B incluem, mas não são limitadas a:

- Angiomatose bacilar.
- Candidíase orofaríngea.
- Candidíase vulvovaginal; persistente, frequente, ou pouco responsive ao tratamento.
- Displasia cervical (moderada ou severa)/ carcinoma cervical *in situ*.

- Sintomas constitucionais como febre (38,5°C) ou diarreia por um período maior que 1 mês.
- Leucoplasia pilosa oral.
- Herpes zoster, envolvendo ao menos dois episódios distintos ou mais que 1 dermatomo.
- Púrpura trombocitopênica idiopática.
- Listeriose.
- Doença inflamatória pélvica, particularmente se complicado por abscesso tubo-ovariano.
- Neuropatia periférica.

Para objetivo de classificação, as condições da categoria B precedem aquelas na categoria A.

Categoria C:

A categoria C inclui as condições clínicas listadas nos critérios de definição de aids e descritas abaixo. Para objetivo de classificação, uma vez que uma condição clínica C tenha ocorrido, o paciente permanecerá na categoria C.

- Candidose de esôfago;
- Candidose de traquéia, brônquios ou pulmões;
- Câncer cervical invasivo;
- Citomegalovirose em qualquer outro local que não sejam fígado, baço e linfonodos; como a retinite por citomegalovírus;
- Criptococose extrapulmonar;
- Criptosporidiose intestinal crônica (período superior a um mês);
- Herpes simples mucocutâneo, por um período superior a 1 mês; ou bronquite, pneumonite ou esofagite;
- Histoplasmose disseminada (localizada em quaisquer órgãos que não exclusivamente em pulmão ou linfonodos cervicais/hilares);
- Isosporidiose intestinal crônica (período superior a um mês);
- Leucoencefalopatia multifocal progressiva (vírus JC, um poliomavírus);
- Linfoma não-Hodgkin de células B (fenótipo imunológico desconhecido) e outros linfomas dos seguintes tipos histológicos: Linfoma maligno de células grandes ou pequenas não clivadas (tipo Burkitt ou não-Burkitt) e Linfoma maligno imunoblástico

sem outra especificação (termos equivalentes: sarcoma imunoblástico, linfoma maligno de células grandes ou linfoma imunoblástico);

- Linfoma primário do cérebro;
- Pneumonia por *Pneumocystis carinii*;
- Reativação de doença de Chagas (meningoencefalite e/ou miocardite);
- Sepses recorrentes por bactérias do gênero *Salmonella* (não tifóide);
- Toxoplasmose cerebral.
- Sarcoma de Kaposi
- Coccidioidomicose disseminada ou extrapulmonar
- Encefalopatia relacionada ao HIV.
- Síndrome *Wasting* devido ao HIV.
- Pneumonia recorrente.
- *Mycobacterium tuberculosis*, em qualquer sítio (pulmonar ou extrapulmonar).
- *Mycobacterium avium* complex or *M. kansasii*, disseminado ou extrapulmonar.
- *Mycobacterium*, outras espécies ou espécies não-identificadas, disseminado ou extrapulmonar.

**Anexo E - Artigo submetido para publicação****Running Title: FACTORS RELATED TO HIV/TUBERCULOSIS CO-INFECTION****FACTORS RELATED TO HIV/TUBERCULOSIS CO-INFECTION IN A LEADING  
BRAZILIAN HOSPITAL**B. M. Carvalho<sup>1</sup>, A. J. Monteiro<sup>2</sup>, R. J. P. Neto<sup>3</sup>, T. B. Grangeiro<sup>4</sup>, C. C. Frota<sup>1</sup>

Laboratório de Pesquisa em Micobactérias, Departamento de Patologia e Medicina Legal<sup>1</sup>,  
Departamento de Estatística e Matemática Aplicada<sup>2</sup>, Laboratório de Genética Molecular,  
Departamento de Biologia<sup>4</sup>, Universidade Federal do Ceará. Hospital São Jose de Doenças  
Infecciosas<sup>3</sup>, Fortaleza, CE, Brasil

**KEY WORDS:**

HIV, *Mycobacterium tuberculosis*, HIV/TB co-infection, risk factors, aids.

**Corresponding author:**

Cristiane Cunha Frota. Rua: Monsenhor Furtado SN. Rodolfo Teófilo. CEP: 60441-750.  
Fortaleza-CE, Brazil. Tel: +55 0xx 85 3366.8303. Fax: +55 0xx 85 3366.2853. E-mail:  
ccfrota@fortalnet.com.br

**ABSTRACT**

Being infected with both Human Immunodeficiency Virus (HIV) and *Mycobacterium tuberculosis* is the main cause of death, when considering infectious agents in the world. This study evaluated the factors relating to the development of tuberculosis (TB) in HIV infected patients who were treated at a leading hospital of infectious diseases in Fortaleza, Ceará, Brazil. Between January 2004 and December 2005, an epidemiological study was carried out through the analysis of the medical records of 171 patients, who were diagnosed as having HIV and tuberculosis. Of the 171 HIV/Tuberculosis (HIV/TB) co-infected patients, 81% were male, which was statistically significant ( $p=0.0006$ ). Co-infection was greater among those over 40 years of age and those with lower (less than eight years of schooling) educational levels (87.8%). Forty-one percent of the patients in the study had not had a smear culture testing for acid-fast bacillus (AFB). CD4 cell counts were lower than 200 cells/ $\mu\text{L}$  in 71.9% of the patients, the average being 169cells/  $\mu\text{L}$ . These observations are important for establishing strategies to improve the control of tuberculosis in HIV infected patients

## INTRODUCTION:

Being infected with both Human Immunodeficiency Virus (HIV) and *Mycobacterium tuberculosis* is the main cause of death, when considering infectious agents in the world [1,2]. Approximately 13 million people are infected with both infection causing agents [3]. Pandemic HIV has increased the prevalence of tuberculosis (TB), mainly in poor and developing countries [4]. The major impact has been in sub-Saharan Africa, where, on average, official reports of TB cases have tripled, since the 1980's. The mortality rate has reached 20%, when compared to 5% in countries with good tuberculosis control programs [3]. Moreover, in these African countries, there is an annual increase of 10% in the number of TB cases, mainly among individuals between 15 and 49 years old [5].

The World Health Organization (WHO) estimated that there would be 9.2 million new TB cases in 2006, resulting in 1.7 million deaths [6]. Of these cases, 7.7% would be HIV/TB co-infected. At the end of 2007, a total of 33.2 million people were HIV positive, resulting in 2.1 million deaths [4].

In Brazil, 78.834 cases of TB were officially reported in 2006, with an incidence in 2005 of 43.8 cases per 100,000 inhabitants. It has been reported by the Brazilian Health Ministry an increasing numbers of TB incidence and of patients who did not complete the full course of antibiotic treatment from 2005 to 2006 [7]. These increases are at least in part an artifact of declining numbers of notified patients, and also heavily influenced by policy changes in case detection, diagnosis, registration, and release from control, and may be misleading [8].

In Ceará, there was a decrease in the number of TB cases, 44.0 per 100,000 inhabitants in 2006 and 40.0 per 100,000 inhabitants in 2007. A total of 3.322 new cases were registered in 2007, of which 56% were bacillary pulmonary tuberculosis. It is estimated that, throughout the state, there were reported cases from 91% of the municipalities; while the remaining 9% of the

municipalities did not report or did not diagnose the cases. Of all registered new cases in 2006, 3.7% (151 cases) were HIV/TB co-infected patients. There was also an increase in the number of cases of HIV/TB co-infection seen in 2005 and 2006 [7,9].

There is, therefore, a much greater risk of HIV/TB co-infected patients developing active TB, either from the latent infection being reactivated or the rapid progression of a new infection [10, 11, 12, 13]. The risk of developing active TB in HIV patients increases from 5% to 15% annually, due to the latent infection being reactivated, which depends on the degree of immunocompromise [12,14,15]. A study conducted among gold miners in South Africa showed that the risk of TB doubles within one year of HIV infection, but only increases slightly during the following years [5]. It has been noted that pulmonary TB occurs relatively early in the spectrum of HIV related infections and often before other AIDS-defining conditions. The increase in the risk of developing TB soon after being infected with HIV might be explained by the risk associated with seroconversion illness or being concurrently infected with HIV and TB. For this reason, people infected with HIV present increased susceptibility to active tuberculosis. HIV is the main risk factor in the development of TB [10,12,16,17,18].

To date, there has been limited epidemiological data regarding risk factors among HIV/TB co-infected patients. Therefore, a case-control study was conducted to determine possible risk factors which were linked to developing TB, among HIV infected patients.

## METHODS

The medical records were examined for all patients who had been confirmed with TB at Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJDI). This is a 118-bed teaching hospital in Northeast Brazil, a leading hospital in treating patients with infectious disease, including AIDS. On average, HSJDI cares for 2,611 HIV-positive patients per month. Patients who sought care at HSJDI at any time from January 2004 to December 2005 were eligible to participate in the study if they were at least 15 years of age and had signs, symptoms or laboratory results suggesting TB and HIV [19]. *M. tuberculosis* was not confirmed by either culture or positive AFB smears for all eligible participants. This project was approved by the HSJDI Ethics Committee.

The 103 patients in the control group were selected randomly from the HIV positive patients without previous or current, confirmed or suspected history of TB, who were receiving care at HSJDI during the same period.

A standardized form was used to collect data regarding age, gender, marital status, social behavior, economic status, clinical, radiological and laboratory tests. All these listed factors, and the others not listed, were identified as being related to TB.

Data was entered using EXCEL for Windows (version 2000) and transferred to SPSS (a statistics program) for analysis. The Student *t*-test was used to compare the means of continuous variables. A non-parametric test (Mann-Whitney test) was also used to compare data with high asymmetry. Univariate analyses of the association of clinical, laboratory and socio-demographic categorical variables were performed using the Chi-square and Fisher tests, estimating the crude odds ratios (OR) with their respective 95% confidence intervals (CI).

## RESULTS

During the study period, 1,309 HIV cases were registered in the state of Ceará [6]. The cases of the co-infected patients at HSJDI who were over 15 years of age, regardless of their HIV clinical stage but with confirmed cases of TB were analyzed. Some of the variables studied are shown in Table 1.

A total of 171 confirmed HIV/TB co-infected cases were reviewed, 139 of which were men (81.3%,  $p=0.0006$ ) and 137 were between 27 and 49 years old (80.6%). The age distribution was asymmetrical with patients from 16 to 78 years old. Regarding marital status, there was a predominance of TB cases among single patients, 73.7% ( $p=0.0265$ ).

The educational level of 146 patients, as well as household size (adults) and income were studied. Educational level is traditionally used as an indicator of socio-economic level. The results of this study show that patients with a lower educational level have a higher risk of developing TB (87.9%,  $p<0.0001$ , relative risk = 2.3633). This is similar to those patients with lower incomes, being equal to or lower than the monthly minimum wage of US\$94.00 (70.9%,  $p=0.6005$ ). However, low income was not statistically significant as a risk factor for TB (relative risk = 1.0506). Among host-related factors, TB was not associated with smoking or with drinking alcohol. On the contrary, these habits were frequently observed among patients without TB ( $p=0.068$  and  $p=0.034$ ). The risk of TB did not increase with a reported family history of TB independent of the kind of contact ( $p = 0.0992$ ).

The site of TB, acid-fast stain, L-J culture and skin test results are shown in Table 2. Of the 171 HIV/TB patients, only 96 (56.14%) had been submitted to acid-fast stain and L-J culture tests. Only 18 of these 96 patients were positive to acid-fast stain and culture, while 13 were acid-fast stain positive and culture negative, and 18 were acid-fast stain negative and culture positive.

Immunocompromise was significant in TB patients, compared to those without TB ( $P < 0.0001$ ). CD4 cell counts of under 200 cells/ $\mu\text{L}$  were observed in 110 (71.9%) of the HIV/TB coinfecting patients.

The percentage of non-reactive PPD (Protein Purified Derivated) was higher ( $p=0.0407$ ) among patients with AIDS (84.5%) compared to those without AIDS (40.0%). Since only a small number of patients took the PPD test, it was not possible to compare the tests to the TB clinical presentations.

While attempting to correlate the CD4 count to the PPD test, it was observed in 73 patients, that neither positive nor negative PPD test results had a significant correlation to the CD4 count ( $p=0.7587$ ) (Fig. 1). It was also observed that there was no specific clinical form of TB associated with the CD4 count ( $p=0.2120$ ) (Fig. 2).

## DISCUSSION

In this study the factors influencing active TB in HIV infected patients were investigated by analyzing control HIV patients without TB. Most patients with HIV/TB co-infection had not been exposed to TB carriers previously. Therefore, this suggests that active TB is a result of either a quick primary progression of a recent infection or reactivation of a latent infection. This finding corresponds to a previous report [20].

Gender (in this case, male), advanced age, marital status and educational levels were correlated to the risk of developing active TB. The results of this study were similar to those seen by Kerr-Pontes et al. [21] and Henn [22], who determined that gender is a high risk factor for developing active TB. In addition, there are more men with registered cases of TB without HIV, at a ratio of 2:1 men to women [23]. It is difficult to explain whether or not the predominance in males is due to the lack of official records for women, being related to social behavior, poor health public service or a combination of both. In contrast to this, Bellamy et al. [24] suggests that there is a relationship between TB susceptibility and chromosome X.

Regarding age, there was a predominance of HIV/TB-infected patients between the age of 41 and 45. Previous studies demonstrated predominance in young adults averaging 33 years of age [12,21,25,26]. The results seen in this study reflect the prolonged survival time of HIV-patients, since the average age of those with registered cases of AIDS in Brazil between 2002 and 2005 was 35.4. [7]. The predominance of TB among single people is also a reflection of socio-economic status, especially among men, who frequently migrate searching for better jobs, and are in contact with more people, thus increasing the probability of exposure to the bacilli.

Educational level may determine the behavior of HIV patients and an understanding of education level may help target interventions in order to modify behavior. There was no association between educational level and drinking or smoking. The majority of the HIV/TB co-

infected patients had less than eight years of schooling and also had low incomes. This association might be a consequence of other health hazards, including the lack of health education and not having access to health care.

Studies have demonstrated the impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on HIV-infected patients, where there have been successful immune restoration and reductions in morbidity and mortality [10,27,28,29,30,31]. Moreover, the use of antiretroviral therapy (ART) in these patients reduces the risk of developing active TB [32,33,34], being associated, in HIV-infected TB patients, with higher rates of survival when used during and after TB treatment compared with patients who do not receive ART [25,27,35]. Our results also show that ART reduces the risk of developing active TB in HIV-patients. However, there were certain limitations in our study relating to the ART. The time of starting ART was not investigated nor were analyses of the safety, adhesion and efficacy of the regimen on the patients. For a number of patients, the results or definite causes of death could not be defined, either because the patients did not return to the hospital or due to the fact that they passed away outside the hospital. In addition, the appropriate management of HIV-associated TB is complicated by drug-drug interactions, overlapping toxicities, immune reconstitution syndrome, and pill burden [10,36]. Nowadays, WHO recommends that HIV-infected TB patients eligible for ART, starts the treatment within two weeks to two months after the beginning of the anti-TB treatment [37].

It was observed that most of our studied patients with HIV/TB co-infection presented very low CD4 cell counts. Most CD4 cell counts were performed while the patients were being given care at the HIV hospital, at the time of HIV diagnosis. The HIV/TB co-infection reflects the synergy of these diseases caused by the *M. tuberculosis* infection that increases the HIV viral load, which consequently induces the host immunosuppression and the bacilli virulence. Thus, HIV-induced immunosuppression increases the likelihood that quiescent *M. tuberculosis* will

reactivate. TB itself up-modulates the host immune system; an activated T-cell that is activated in response to infection from *M. tuberculosis* produces more HIV than a quiescent cell such that HIV expression increases in the face of co-infections. In this manner, the high HIV viral load increases the rate of disease progression and also increases HIV infectiousness [11].

According to the literature [38,39,40], the clinical and radiological presentation of TB in HIV infected patients with CD4 cell counts above 350 cell/mm<sup>3</sup> is similar to that seen in individuals who are not infected with HIV. While in patients with low CD4 counts, TB can have an atypical presentation, with extrapulmonary involvement or disseminated infection. Approximately half of the studied patients presented either extrapulmonary TB or disseminated TB. This observation is related to the high degree of immunosuppression seen in studied patients as discussed above. In such patients, HIV-induced impairment of cellular immunity allows the development of pulmonary infiltrates in any region of the lung, typically without cavitations but accompanied by intrathoracic lymph node enlargement [40]. In contrast to this, Kerr-Pontes et al. [21], in a study conducted in the same state, observed an incidence of extrapulmonary TB of 23.9%; however, they did not evaluate the level of immunocompromise.

It should be noted that this study also evaluated the importance of sputum AFB smears and sputum cultures as basic TB diagnostic tools. However, the sputum smears of HIV/TB co-infected patients are more likely to be low grade positive or negative. As a result, it is difficult to diagnose of extrapulmonary or disseminated TB, especially involving deep sites which are difficult to reach to collect samples [38]. In addition, these patients are considered to transmit less TB infection since they have less lung cavitation [41]. Although the use of sputum cultures should be encouraged to assist in the diagnosis of HIV-related TB, it was observed that 41% of the patients were not submitted to sputum cultures, while Kerr-Pontes et al. [21] found that 54% of their patients had not been submitted to this procedure. Despite a slight reduction in the

number of HIV patients not tested by sputum culture, it is important to perform this test in order to improve TB diagnosis. Furthermore, more rapid and simple culture methods are needed in order to expand and decentralize their use. Tuberculosis screening also offers the opportunity to provide treatment of latent tuberculosis infection (prevention therapy) for people living with HIV, in where active TB has been excluded [42].

In conclusion, various factors such as gender, age, marital status, low CD4 cell counts and the use of ART might influence TB in HIV patients. The acid-fast stain and culture examinations should be considered together to assess active TB in HIV patients. The interaction between HIV and TB programs will lead to more effective treatment and control of TB among HIV patients.

**ACKNOWLEDGMENTS:**

We thank the patients who participated in the study and the staff at Hospital São José de Doenças Infecciosas.

## REFERENCES:

1. Weiss R.A., McMichael A.J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nat Med* **2004**; 10(12): s70-76.
2. Friedland G., Churchyard, G.J., Nardell E. Tuberculosis and HIV Coinfection: Current State of Knowledge and Research Priorities. *J Infect Dis* **2007**; 196(1):S1-S3.
3. Nunn P., Williams B., Floyd K., et al. Tuberculosis control in the era of HIV. *Nat Rev Immunol* **2005**; 5: 819-826.
4. UNAIDS. AIDS epidemic update: December 2007. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data* **2007**.
5. Sonnenberg P., Glynn J.R., Fielding K., et al. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *J Infect Dis* **2005**; 191: 150-158.
6. WHO Report 2008. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. *Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007 376)* **2008**.
7. Ministerio da Saude-Brasil. Indicadores e Dados Básicos - Brasil 2008. *DATASUS* <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>; **2008**.
8. Nadol P., Stinson K.W., Coggin W., et al. Electronic tuberculosis surveillance systems: a tool for managing today's TB programs. *Int J Tuberc Lung Dis* **2008**; 12(3):8-16.
9. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Informe Epidemiológico: Tuberculose. *Coordenadoria em políticas em saúde* <http://www.saude.ce.gov.br/internet/>; **2008**.
10. Goldfeld A., Ellner J.J. Pathogenesis and management of HIV/TB co-infection in Ásia. *Tuberculosis* **2007**; 87:S26-S30.

11. Vermund S.H., Yamamoto N. Co-infection with human immunodeficiency virus and tuberculosis in Asia. *Tuberculosis* **2007**; 87:S18-S25.
12. Albalak R., O'Brein R.J., Kamemerer S. et al. Trends in Tuberculosis/Human Immunodeficiency Virus Comorbidity, United States, 1993-2004. *Arch Inter Med* **2007**; 167(22):2443-2452.
13. Carvalho A.C.C., DeRiemer K., Nunes Z.B., et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis to Contacts of HIV-infected Tuberculosis Patients. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 164: 2166–2171.
14. Young D.B., Perkins M.D., Duncan K. et al. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J. Clin. Invest.* **2008**; 118:1255–1265.
15. Mendelson M. Diagnosing tuberculosis in HIV-infected patients: challenges and future prospects. *Br Med Bull* **2007**; 81- 82: 149–165.
16. Lazarus J.V., Olsen M., Ditiu L., et al. Tuberculosis–HIV co-infection: policy and epidemiology in 25 countries in the WHO European region. *HIV Med.* **2008**; Published article online: 10-Apr-2008
17. Asten L.V., Langendam M., Zangerle R., et al. Tuberculosis risk varies with the duration of HIV infection: a prospective study of European drug users with known date of HIV seroconversion. *AIDS* **2003**; 17:1201–1208.
18. Matos D.E., Lemos A.C.M., Bittencourt C., et al. Prevalence of HIV infection in patients hospitalized for tuberculosis in Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis* **2007**; 11(2):208-211.
19. Ministerio da Saude-Brasil. Criterios de definicao de casos de aids em adultos e criancas. Secretaria de Vigilancia em Saude Programa Nacional de DST e Aids **2003**.
20. Ho J.L. Co-Infection with HIV and Mycobacterium tuberculosis: Immunologic Interactions, Disease Progression, and Survival. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1996**; 91(3): 385-387.

21. Kerr-Pontes L.R.S., Oliveira F.A.S., Freire C.A.M. Tuberculose associada à AIDS: situação de região do Nordeste brasileiro. *Rev. Saúde Pública* **1997**; 31(4): 323-329.
22. Henn L., Nagel F., Dal Pizzol F. Comparison between Human Immunodeficiency Virus Positive and Negative Patients with Tuberculosis in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1999**; 94(3): 377-381.
23. Holmes C.B., Hausler H., Nunn P. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**; 2(2): 96-104.
24. Bellamy R., Beyers N., McAdam K.P.W.J., et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: A genome-wide scan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**; 97(14): 8005–8009.
25. Sanguanwongse N., Cain K.P., Suriya, P., et al. Antiretroviral therapy for HIV-infected tuberculosis patients saves lives but needs to be used more frequently in Thailand. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2008**; 48(2):81-89.
26. Eyob G., Guebrexabher H., Lemma E., et al. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-infected and -uninfected Ethiopians and its impact on outcome after 24 months of follow-up. *Int J Tuberc Lung Dis* **2004**; 8(11): 1388–1391.
27. Akksilp S., Karnkawinpong, P., Wattanaamornkiat W., et al. Antiretroviral therapy during tuberculosis treatment and marked reduction in death rate of HIV-infected patients, Thailand *Emerging Infectious Diseases* **2007**; 13(7):1001-1007.
28. Harries A.D. Safety, effectiveness, and outcomes of concomitant use of highly active antiretroviral therapy with drugs for tuberculosis in resource poor settings. *Lancet* **2006**; 367:944–5.
29. Mocroft A., Ledergerber B., Katlama C., et al. Decline in the AIDS and death rates in the Euro-SIDA study: an observational study. *Lancet* **2003**; 362:22–29.

30. Dean G.L., Edwards S.G., Ives N.J., et al. Treatment of tuberculosis in HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **2002**; 16:75–83.
31. CASCADE collaboration. Survival after introduction of HAART in people with known duration of HIV-1 infection. *Lancet* **2000**; 355: 1158-1159.
32. Girardi E., Antonucci G., The GISTA–SIMIT Study Group, et al. Tuberculosis in HIV-infected persons in the context of wide availability of highly active antiretroviral therapy. *Eur Respir J* **2004**; 24: 11–17.
33. Williams B.G., Dye C. Antiretroviral Drugs for Tuberculosis Control in the Era of HIV/AIDS. *Science* **2003**; 301: 1535-37.
34. Jones J.L., Hanson D.L., Dworkin M.S., DeCock K.M., The Adult/Adolescent Spectrum of HIV Disease Group. HIV-associated tuberculosis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Int J Tuberc Lung Dis* **2000**; 4(11):1026–1031.
35. Breen R.A., Miller R.F., Gorsuch T., et al. Virological response to highly active antiretroviral therapy is unaffected by anti-tuberculosis therapy. *J Infect Dis.* **2006**; 193:1437–1440.
36. McIlleron, H., Meintjes, G, Burman, W.J. Complications of antiretroviral therapy in patients with tuberculosis: drug interactions, toxicity, and immune reconstitution inflammatory syndrome. *J Infect Dis* **2007**; 196(1):S63-S75.
37. Harries A., Maher D., Graham S. *TB/HIV: A Clinical Manual*. 2nd ed. **2004**; Geneva, Switzerland: World Health Organization;
38. Sharma S.K., Mohan A. Extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* **2004**; 120: 316-53.
39. Sharma S.K., Mohan A., Kadiravan T. HIV-TB co-infection: Epidemiology, diagnosis & management. *Indian J Med Res* **2005**; 121: 550-567.

40. Picon P.D., Caramori M.L.A., Bassanesi S.L., et al. Differences in the clinical and radiological presentation of intrathoracic tuberculosis in the presence or absence of HIV infection. *J Bras Pneumol.* **2007**; 33(4):429-436.
41. Narain J.P., Lo Y.R. Epidemiology of HIV-TB in Asia. *Indian J Med Res* **2004**; 120: 277-28.
42. Reid A., Scano F., Getahun H., et al. Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, and support: the role of tuberculosis/HIV collaboration. *Lancet Infect Dis* **2006**; 6(8):483-495.

Table 1. Regression analysis of possible risk factors for TB in HIV/TB coinfecting patients:

	HIV + TB n				<i>p</i> -value	RR	Odds ratio (95% CI)
	HIV n (%)		TB n (%)				
<i>Total (n)</i>	103		171				
<i>Sex</i>							
Male	64	31.53	139	68.47	0.0006	1.5192	2.6470
Female	39	54.93	32	45.07			(4.0962, 15.0599)
<b>Age (mean)</b>	36	±10.61	41	±10.93	0.0001		
<i>Marital status</i>							
Single	60	32.26	126	67.74	0.0265	1.2742	1.8500
Others	37	46.84	42	53.16			(1.0799, 3.1693)
<i>Schooling</i>							
< 8 years	36	19.89	145	80.11	<0.0001	2.3633	7.8542
> 8 years	39	66.10	20	33.90			(4.0962, 15.0599)
<i>Income</i>							
<1 MW <sup>a</sup>	34	23.29	112	76.71	0.6005	1.0506	1.2174
>1 MW	17	26.98	46	73.02			(0.6193, 2.393)
<b>HH<sup>b</sup> contacts</b>							
Yes	3	21.43	11	78.57	0.0992	1.4311	3,0119
No	69	45.10	84	54.90			(0.808, 11.2269)
<i>Smoking</i>							
Yes	36	43.37	47	56.63	0.0680	0.8206	0.5864
No	53	30.99	118	69.01			(0.3411, 1.008)
<i>Alcohol</i>							
Yes	51	44.74	63	55.26	0.0034	0.7531	0.4481

No	37	26.62	102	73.38			(0.2645, 0.7591)
<b>CD4 cells count</b>							
(mean)	377	± 269	169	± 119	<0.0001		
<b>Number of adults in HH</b>							
(mean)	3.4	±2.398	3.0	±1.705	0.2349		
<b>HAART<sup>c</sup></b>							
Yes	57	55.34	153	89.47	2.5905	6.8596	0.0000
No	46	44.66	18	10.53			(4.0962, 15.0599)

---

RR , rate ratio; CI, confidence interval

<sup>a</sup> MW, monthly minimum wage (USD\$94.00)

<sup>b</sup> HH, household

<sup>c</sup> HAART, highly active antiretroviral therapy

Table 2. Distribution of TB cases according to site, skin test reaction and microbiology analysis (Lowestein-Jensen culture and Acid-Fast stain):

	<b>Total</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<i>Site</i>	38		
Pulmonary		18	47.37
Extrapulmonary		16	42.11
Disseminated		4	10.53
<i>Skin Test</i>	171		
Reactive		15	8.77
Non-reactive		62	36.26
Not Done		94	54.97
<b><i>Microbiologic Analysis</i></b>	96		
Culture positive			
Acid-Fast stain positive		18	18.75
Acid-Fast stain negative		18	18.75
Culture negative			
Acid-Fast stain positive		13	13.54
Acid-Fast stain negative		47	48.96

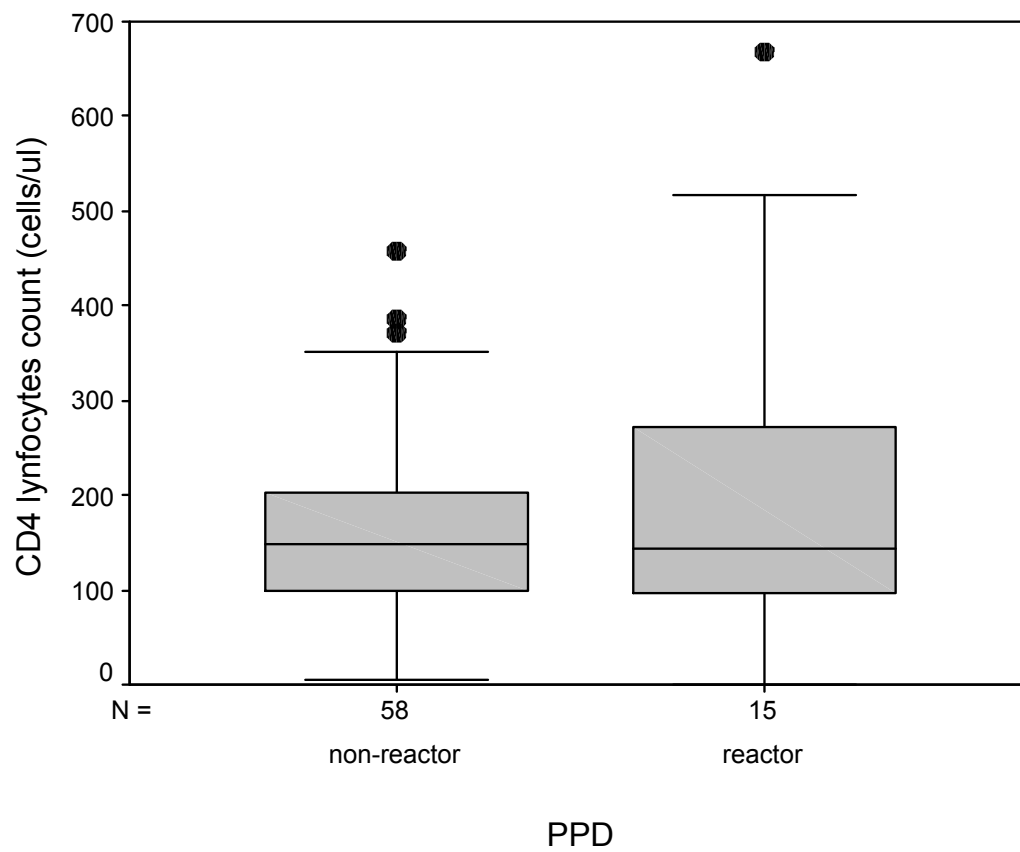
Figure 1:

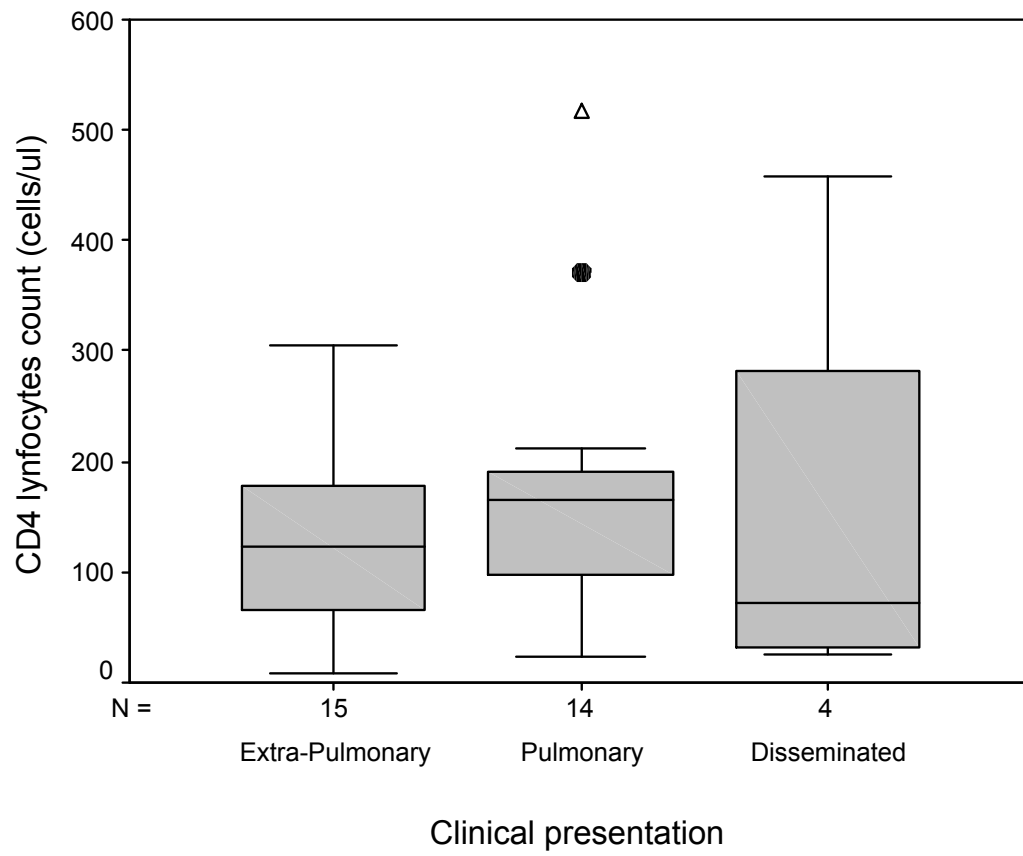
Relation between CD4<sup>+</sup> lymphocyte count (cells/ $\mu$ L) and PPD skin test. The symbol • represents extreme values. Reaction to PPD was considered positive when equal or greater than 5 mm.

Figure 2:

Relation between CD4<sup>+</sup> lymphocyte count (cells/ $\mu$ L) and clinical presentation according to the site of the infection. The symbol • represents extremes values and □ represents outliers.

Figure 1:



**Figure 2:**

## **Anexo F - Apresentações em congressos**

### **Trabalho apresentado no Congresso Norte-Nordeste de Resistência Bacteriana, realizado em Recife – PE.**

PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Mycobacterium tuberculosis* EM PACIENTES CO-INFECTADOS COM HIV NO HOSPITAL SÃO JOSÉ - FORTALEZA-CE

**Bráulio Matias de Carvalho**, Isabela Cárdua Neves, Thalles Barbosa Grangeiro, Cristiane Cunha Frota, Creusa Lima Campelo, Roberto da Justa Pires Neto, Elicélia Alencar de Góis, Maria Vânia Freitas Gonçalves. Endereço: Rua Monsenhor Furtado, S/N. Rodolfo Teófilo. CEP.: 60441-750, Fortaleza-Ce, e-mail: [braulio\\_matias@yahoo.com.br](mailto:braulio_matias@yahoo.com.br).

#### INTRODUÇÃO:

A infecção pelo vírus HIV e a tuberculose estão entre as principais causas de morte por agentes infecciosos no mundo (Weiss e McMichael, 2004), aproximadamente 13 milhões de pessoas estão infectadas com ambos agentes causadores (WHO, 2003). A pandemia do HIV aumentou globalmente a prevalência da tuberculose, principalmente em países pobres e subdesenvolvidos (WHO, 2000). O maior impacto tem sido na África sub-Sahariana, onde as notificações de casos de TB têm, em média, triplicado desde meados dos anos 80 e as taxas de mortalidades no tratamento chegaram a 20% comparados com os 5% observados em bons programas de controle de tuberculose sem HIV (Nunn *et al*, 2006).

A Organização Mundial da Saúde estimou em 8,8 milhões os novos casos de tuberculose em 2003 com 1,7 milhões de óbitos causados pela doença. Deste total de casos, 8% estavam co-infectados pelo HIV (WHO, 2005). No estado do Ceará, observou-se um aumento nas taxas de incidência entre os anos de 2004 e 2005, passando de 49,4 para 50,1 casos por 100.000 habitantes. Isso representa, em 2005, um total de 4059 casos de tuberculose notificados no estado. Das notificações de 2005, 2,4% (111 casos) representam pacientes co-infectados com HIV. Além disso, nos anos de 2004 e 2005, tem observado um aumento no percentual de casos de co-infecção com HIV entre os pacientes com diagnóstico de tuberculose (SESA, 2006).

Os pacientes co-infectados HIV-TB têm maior chance de desenvolver uma reativação endógena de uma TB latente ou rapidamente progredirem para uma doença ativa a partir de uma

infecção recente (Carvalho *et al*, 2001). Desta forma, os indivíduos infectados pelo HIV apresentam susceptibilidade aumentada para tuberculose ativa, e o HIV é o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença tuberculosa (Asten *et al*, 2003),

Não existem dados publicados no Ceará sobre a identificação e o perfil de sensibilidade dos isolados de micobactérias de pacientes com aids

#### OBJETIVO:

O objetivo deste trabalho é analisar o perfil de sensibilidade das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isolados em pacientes co-infectados com HIV no ano de 2005 no hospital de referência em doenças infecciosas no estado do Ceará.

#### METODOLOGIA:

Trata-se de um estudo retrospectivo, onde foram avaliados os pacientes co-infectados com micobactérias e HIV atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas no ano de 2005. De cada paciente, os seguintes dados contidos em prontuários foram coletados: idade, sexo, estado civil, renda, escolaridade, número de adultos residindo na mesma casa, uso de bebidas alcoólicas, tabagismo, tratamento prévio de tuberculose, tuberculose ativa, teste cutâneo de PPD (tuberculina), profilaxia para tuberculose, contato prévio com paciente com TB, dados laboratoriais (dosagem de CD4+, carga viral e espécie de micobactéria isolada com TSA). As amostras clínicas dos pacientes foram processadas para o cultivo primário em Lowestein-Jensen e posteriormente submetidas à identificação por provas bioquímicas, incluindo o ácido para-nitrobenzóico (PNB). Os testes de sensibilidade foram realizados pelo Método das Proporções de Canetti.

#### RESULTADOS:

Foram analisados os dados de 26 pacientes. Assim como relatado em literatura (Kerrpontos, 1997; Lienhardt, 2005; Henn, 1999), houve uma predominância de casos entre o sexo masculino (76,9% dos casos). Em relação à faixa etária no momento do diagnóstico, foi

observado uma maioria importante entre os indivíduos adultos jovens, com 73% dos pacientes com idade entre 20 e 39 anos e a idade foi de 34,7 anos. Henn (1999) também demonstrou que pacientes com infecção por *M. tuberculosis* e HIV tendem a ser mais jovens e do sexo masculino.

A forma clínica predominante foi a pulmonar (34,6%) seguida pela ganglionar (23,0%) e disseminada (15,4%), sendo observado um expressivo número de sítios acometidos (ver tabela). Esses dados diferem dos previamente relatados nos quais a forma pulmonar representava 76,1% dos casos de tuberculose em pacientes co-infectados com HIV no Nordeste brasileiro (Kerr-pontes, 1997). Essa disparidade pode representar uma diferença metodológica entre os trabalhos, uma vez que, somente foram incluídos no presente trabalho, pacientes que tinham diagnóstico de micobacteriose com confirmação por cultura. O *M. tuberculosis* representou 88,5% (23) dos isolados identificados. Dos isolados de *M. tuberculosis*, 2 (8,7%) apresentavam resistência a isoniazida e 1 (4,3%) expressava resistência a duas drogas (isoniazida e rifampicina). Barroso *et al* (2001), em um estudo prevalência de tuberculose multirresistente no estado do Ceará evidenciou que 27% das cepas apresentavam alguma resistência, 8,1% apresentavam monorresistência e 9,6% tinham resistência a duas drogas, sendo estas rifampicina e isoniazida. Foram isoladas 3 amostras de micobactérias não-tuberculose, sendo 2 obtidas de sítio pulmonar e uma meníngea. Das micobactérias atípicas (3 amostras) identificadas, duas estão em processo de identificação e outra era *M. avium*. Foi evidenciado, portanto, uma multiplicidade de formas clínicas e um percentual significativo de isolados apresentando resistência à pelo menos uma droga.

#### BIBLIOGRAFIA:

1. Asten *et al*, 2003. Tuberculosis risk varies with the duration of HIV infection: a prospective study of European drug users with known date of HIV seroconversion. *AIDS*. 17:1201–1208.
2. Barroso, E.C., Rodrigues, J.L.N., Pinheiro, V.G.F., Campelo, C.L. 2001. Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. *J Pneumol*. 27(6): 310-314.
3. Carvalho *et al*, 2001. Transmission of Mycobacterium tuberculosis to Contacts of HIV-infected Tuberculosis Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 2166–2171.

4. Henn, L., Nagel, F., Dal Pizzol, F. (1999). Comparasion between Human Immunodeficiency Virus Positive and Negative Patients with Tuberculosis in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(3) :377-381.
5. Kerr-Pontes, L. R. S. *et al* 1997. Tuberculose associada à AIDS: situação de região do Nordeste brasileiro. *Rev. Saúde Pública* 31(4): 323-9.
6. Lienhardt, C. *et al* 2005 Investigation of the risk factors for tuberculosis: a case-control study in three countries in West Africa. *Int J Epidemiol* 34:914-923.
7. Nunn, P., Williams, B., Floyd, K., Dye, C., Elzinga, G., Raviglione, M. 2006. Tuberculosis control in the era of HIV. *Nat. Rev. Immunol.* 5:819-826.
8. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará – SESA. Boletim Epidemiológico: Tuberculose, 2006.
9. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará – SESA. Pacto de Indicadores de Atenção Básica. 2006.
10. Weiss, R. A., McMichael A. J., 2004. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nat. Med.* 10(12): s70-s76.
11. World Health Organization . Global tuberculosis Control. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 2000.
12. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing (WHO, Geneva, 2005).
13. World Health Organization. Report of the Third Global TB/HIV Working Group meeting: ‘Two diseases: one patient’ (WHO, Geneva, 2003).