

GABRIEL VILELLA KOZAKEVICH

**Recuperação de *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica da
Reação em Cadeia da Polimerase em aerossóis gerados pela tosse.**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Medicina, da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial ao grau de Bacharel em
Medicina.**

Florianópolis

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

2012

GABRIEL VILELLA KOZAKEVICH

**Recuperação de *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica da
Reação em Cadeia da Polimerase em aerossóis gerados pela tosse.**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Medicina, da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial ao grau de Bacharel em
Medicina.**

Presidente do Colegiado: Prof. Dr Carlos Eduardo Pinheiro

Professor Orientador: Prof. Dra. Rosemeri Maurici da Silva, MD, PhD

Florianópolis

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Daniel Norberto Kozakevich e Conceição Aparecida Vilella, e ao meu irmão Ariel Alejandro Kozakevich, por terem estado comigo em todos os momentos fundamentais na minha trajetória de vida, construindo com seu amor a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, professora Dra. Rosemeri Maurici da Silva por todo o apoio e compreensão dado durante o período de quase três anos de pesquisa, sendo sempre uma figura de admiração e exemplo no campo profissional e pessoal, nunca deixando de estar presente em nenhuma etapa de todo o processo do projeto. À professora Dra. Maria Luiza Bazzo, por disponibilizar toda a estrutura de seu laboratório, proporcionando sempre um ambiente acolhedor e amigável para minha inicialização na experimentação laboratorial, e fornecendo seus conhecimentos biomoleculares que tanto expandiram minha visão sobre o assunto. Em especial às Bioquímicas Ma. Letícia Muraro Wildner e Ma. Christiane Nogueira, por terem auxiliado em todas as etapas do processo de pesquisa, sendo fundamentais e imprescindíveis para o sucesso e conclusão deste, e pelas quais tenho profundo respeito e admiração. A todos os integrantes do laboratório, por tornarem o ambiente de trabalho um lugar extremamente agradável para o convívio, por sempre me receberem com alegria em seus círculos, e me proporcionarem momentos de agradáveis, risadas e amizade. À professora Mônica Gruner por proporcionar toda a estrutura de coleta e interação com os pacientes internados no Hospital Nereu Ramos, participantes do estudo. À minha família, por me presentear com a oportunidade de traçar um caminho acadêmico e de vida tão privilegiado.

RESUMO

Introdução: A tuberculose é uma das doenças mais antigas da humanidade sendo causada por bactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 100 milhões de pessoas são infectadas pelo *M. tuberculosis* a cada ano e, nos países subdesenvolvidos, entre 30% e 60% dos adultos estão infectados. Dos infectados, 8 a 10 milhões desenvolverão a doença durante a vida, sendo que cerca da metade apresentará formas contagiantes. O quadro completa-se com três milhões de óbitos conhecidos e determinados, anualmente. O bacilo da tuberculose é transmitido por inalação de gotículas infecciosas dispersas no ar por um paciente infectado através da tosse, do espirro e da fala. O desenvolvimento de uma técnica alternativa de coleta teria impacto tanto no diagnóstico precoce como na interrupção da cadeia de transmissão da doença, principalmente em indivíduos paucibacilares, evitando a realização de técnicas invasivas para obtenção das amostras respiratórias, e a necessidade de cultura, que leva em média de três a seis semanas para fornecer o resultado.

Objetivos: Este estudo teve por objetivo desenvolver um protótipo de coleta de aerossóis e avaliar o rendimento da recuperação por PCR do *M. tuberculosis* no material aerossolizado pela tosse, tomando-se como padrão áureo os resultados obtidos na cultura de escarro, avaliando o rendimento da recuperação de acordo com os diferentes alvos moleculares.

Métodos: No período de 18 meses foram avaliadas amostras de escarro de todos os pacientes acima de 18 anos internados no Hospital Nereu Ramos, Florianópolis – SC, com diagnóstico de tuberculose pulmonar, que obedecessem aos critérios de seleção previamente estabelecidos. O material coletado foi enviado ao laboratório de análise, onde foram realizadas as extrações e PCR's do DNA presente nos materiais constituintes do protótipo. O *Mycobacterium tuberculosis* foi recuperado em 62,9% das amostras, tendo maior rendimento a técnica que analisou o ágar a fresco retirado do fundo do protótipo e utilizou o alvo genético IS6110 na PCR.

Resultados: O estudo demonstrou a viabilidade da recuperação do *Mycobacterium tuberculosis* através do desenvolvimento de um protótipo simples e de baixo custo, e da coleta de aerossóis de pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar, por meio da técnica de PCR.

Palavras chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Protótipo. Diagnóstico. PCR

ABSTRACT

Background: Tuberculosis is one of the most ancient diseases of the human kind, caused by bacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. According to the Health World Organization, about 100 millions of people are infected by the *M. tuberculosis* each year, and in developing country, between 30% to 60% of the adults are infected. From this amount, 8 to 10 million will develop the disease during their life time and half of them will present the contagious form. This picture is completed with three million deaths known and determined annually. The tuberculosis bacillus is transmitted by the inhalation of infectious droplets dispersed in the air by an infected patient through coughing, sneezing and talking. The development of an alternative collection technique would have an impact in the early diagnosis as in the interruption of the transmission chain of the disease, particularly in paucibacillary individuals, avoiding the use of invasive techniques for obtaining respiratory specimens, or the necessity of cultures, which takes an average of three to six weeks to provide a result.

Objective: This study has the purpose to develop a collector prototype of aerosols, and to evaluate the performance of the recovery of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR in the material aerosolized by coughing, taking the sputum culture as the gold standard result, evaluating the efficiency of recovery according to the different molecular targets.

Method: During 18 months there were evaluated sputum samples of all patients over 18 years old, who were hospitalized at the Nereu Ramos Hospital, Florianópolis- SC, by the diagnosis of pulmonary tuberculosis, who met the criteria previously established. The collected material was sent to laboratory for analysis, where extractions and PCR's of the DNA present in the constituent materials of the prototype were performed. *Mycobacterium tuberculosis* was recovered in 62, 9% of the samples, with higher throughput technique that examined the fresh agar taken from the button of the prototype and used the target gene IS6110 in the PCR.

Results: This study demonstrates the feasibility of the recovery of the *Mycobacterium tuberculosis* through the development of a cheap and simple prototype and the aerosols collect from patients with the diagnosis of pulmonary tuberculosis by means of PCR.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Prototype. Diagnosis. PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1: Fluxograma descrevendo os procedimentos realizados com as amostras..... | 25 |
| Figura 2: Máscara utilizada no desenvolvimento do protótipo..... | 26 |
| Figura 3: Filtro utilizado no desenvolvimento do protótipo..... | 26 |
| Figura 4: Aplicação do caldo de cultivo Middlebrook 7H10 no fundo do protótipo..... | 26 |
| Figura 5: Armazenamento do protótipo em embalagem estéril..... | 26 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Rendimento das técnicas tomando-se como padrão áureo a cultura de escarro..... | 32 |
| Tabela 2 : Resultado da baciloscopia de acordo com o padrão radiográfico..... | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| AAN | Amplificação de Ácidos Nucleicos |
| BAAR | Bacilo Ácido Álcool Resistente |
| BCG | Bacile-Calmmet-Guérin |
| BK | Bacilo de Koch |
| °C | Graus Celsius |
| CDC | Center of Disease Control |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| dNTP | Desoxinucleosídeo trifosfato |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HNR | Hospital Nereu Ramos |
| LACEN | Laboratório Central de Saúde Pública |
| LBMM | Laboratorio de Biologia Molecular e Micobactérias |
| LJ | Löwestein-Jensen |
| Kb | Kilo bases |
| MDR | Multi Droga Resistente |
| MS | Ministério da Saúde |
| MOTT | Outro <i>Mycobacterium</i> que não Tuberculosis |
| MTB | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| Pb | Pares de Bases |
| PCR | Polimerase Chain Reaction |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PPD | Proteína Derivada Purificada (Prova Tuberculínica) |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| Rpm | Rotações por minuto |
| rRNA | Ácido Ribonucleico Ribossomal |
| SE | Sensibilidade |
| SINAN | Sistema Nacional de Agravos de Notificação |

| | |
|------|--|
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TAE | Tris-acetato-EDTA |
| TB | Tuberculose |
| UFSC | Universidade Federal de Santa Catarina |
| UV | Ultravioleta |
| VPN | Valor Preditivo Negativo |
| VPP | Valor Preditivo Positivo |
| ZN | Ziehl Nielsen |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | V |
| ABSTRACT..... | VI |
| | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 HISTÓRICO/DEFINIÇÃO..... | 1 |
| 1.2 CONCEITO..... | 3 |
| 1.3 PREVALÊNCIA..... | 5 |
| 1.4 HISTÓRIA DA EVOLUÇÃO E FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA..... | 9 |
| 1.4.1 TRANSMISSÃO..... | 9 |
| 1.4.2 HISTÓRIA NATURAL DA TUBERCULOSE..... | 10 |
| 1.5 QUADRO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO..... | 13 |
| 1.5.1 EXAMES COMPLEMENTARES..... | 16 |
| 1.5.2 PCR..... | 18 |
| 1.5.3 AEROSSÓIS..... | 22 |
| 2 OBJETIVOS..... | 23 |
| 3 METODOLOGIA..... | 24 |
| 3.1 ASPECTOS ÉTICOS..... | 24 |
| 3.2 AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO..... | 24 |
| 3.3 BACIOSCOPIA..... | 27 |
| 3.4 CULTIVO DE MICOBACTERÍAS..... | 27 |
| 3.5 EXTRAÇÃO DE DNA..... | 28 |
| 3.6 PCR..... | 29 |
| 3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS..... | 30 |
| 4 RESULTADOS..... | 31 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 34 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 42 |
| | |
| REFERÊNCIAS..... | 43 |
| NORMAS ADOTADAS | |

APÊNDICE A
APÊNDICE B
ANEXO 1

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Histórico e definição:

A tuberculose é uma das doenças mais antigas da humanidade, afligindo o homem durante toda a sua história e pré-história. O *Mycobacterium*, causador da doença, tem origem estimada em 150 milhões de anos, tendo provavelmente, durante o período de contato humano, matado mais pessoas do que qualquer outro microorganismo patogênico. Há registros da doença em múmias egípcias, em trechos de livros hebraicos bíblicos, em antigos escritos chineses e em estudos de Hipócrates na Grécia antiga, revelando a presença letal do patógeno na maioria das principais civilizações na história do homem. ¹

A tuberculose, em seus primórdios deve ter atingido inicialmente animais, através de uma variante que antecedeu o *Mycobacterium bovis*. A zoonose provavelmente se disseminou pelo consumo humano de carne ou leite contaminado. Aos poucos, novas linhagens mutantes, de localização pulmonar e melhor transmissão aerógena associada a uma menor virulência, facilitando a disseminação do patógeno, conseguiram firmar-se como parasitas importantes da espécie humana. ¹

Estima-se que a doença tenha tido sua origem no continente africano, entre 15 a 20 mil anos atrás, quando houve os primeiros contatos do patógeno com hominídeos. Afetando grande parte das civilizações desenvolvidas no continente, a doença se alastrou pelos demais continentes sendo levada pelos contingentes populacionais migratórios que povoaram o planeta. ²

Mesmo tendo grande prevalência na Antiguidade, a doença teve sua grande expansão e disseminação durante o período colonial pelas potências européias, eclodindo como a grande epidemia do século XVIII. Neste período a doença foi responsável pela infecção de quase 100% da população européia, sendo responsável por 25% das mortes em adultos. Incentivada também pela urbanização capitalista e pelo aglomerado populacional em grandes cidades, a “grande peste branca”, como ficou conhecida a epidemia, se alastrou por mais de 300 anos, declinando sem nenhuma interferência humana. A explicação para tal comportamento ainda permanece duvidosa, porém é bem provável que a melhora das condições habitacionais,

associada a uma imunidade herdada da seleção da população geneticamente resistente e a melhora nutricional, possam ter influenciado no fenômeno. ¹

A disseminação da doença pelas Américas, decorreu do contato com navegantes europeus, na época das grandes navegações. A prova bacteriológica mais antiga encontrada sobre a presença do patógeno nas Américas remonta a 1.1100 AC, encontrada em uma índia inca, possuidora de sinais clínicos e bacilos preservados em seu corpo mumificado pelas condições ambientais onde havia sido sepultada. Muito embora o *Mycobacterium tuberculosis* e o *Mycobacterium bovis* já existissem entre os povos pré-colombianos, foi o contato prolongado com exploradores europeus o fator disseminador da doença. Entretanto, somente mais tarde, no século XX, com a urbanização experimentada pelos países americanos, é que realmente houve a explosão epidêmica da tuberculose em todo o continente, inclusive no Brasil. ³

Durante a renascença européia houve grande aumento do conhecimento médico e sobre a doença. Antes deste período, a principal conduta na Europa medieval para o tratamento da Tuberculose era o chamado toque real, onde centenas de pacientes acometidos eram levados para serem tocados pelas mãos “terapêuticas” de reis. Foi o surgimento de novas investigações sobre a patologia, como pelo pesquisador francês Laennec, conhecido pela invenção do estetoscópio, que elucidou a patogênese da tuberculose e unificou o conhecimento da doença, desenvolvendo termos e achados até hoje utilizados na prática clínica. Porém, foi somente mais tarde, em 1865, que um cirurgião militar francês chamado Jeann-Antoine Villemin demonstrou a natureza infecciosa da doença, inoculando líquido purulento de cavidades tuberculínicas em coelhos saudáveis e observando a evolução da doença nos mesmos. ²

Finalmente em março de 1882, Heinrich Hermann Robert Koch isolou com sucesso o agente causador da tuberculose, demonstrando não só o bacilo como também estabelecendo postulados clássicos sobre a natureza da identificação de padrões infecciosos nas patologias humanas, sendo homenageado na época com o prêmio Nobel em Medicina. Décadas depois, a contribuição de várias pesquisas resultou no desenvolvimento de uma vacina por Clemens Freiherr Von Pirquet, em 1907, e de um teste diagnóstico por Florence Seibert, em 1930, que desenvolveu a proteína derivada purificada (PPD), utilizada até os tempos de hoje. ²

O conhecimento do teste dérmico de reação tuberculínica, estipulou ainda um novo conceito, o de infecção latente, constatado por pesquisadores como Carrol Palmer, Leroy Bates e Edwards, ao verificarem testes de hipersensibilidade à proteína purificada em crianças

e adultos assintomáticos com resultados muito similares àqueles encontrados em pacientes com a forma ativa da doença.²

Uma vacina efetiva somente foi alcançada no instituto Pasteur, onde Calmet e colaboradores utilizaram o *Mycobacterium bovis* atenuado para a criação da BCG (Bacille-Calmet-Guérin), em 1921. Aceita posteriormente como forma efetiva de imunização da população, a vacina foi estabelecida como método preventivo principalmente em crianças, inicialmente, e finalmente mais especificamente em neonatos.²

A descoberta de medicação efetiva no controle da doença ativa tardou, entretanto, mais algumas décadas, sendo iniciada pela formulação de bacteriostáticos, tais como o Ácido Paramino Salicílico, em 1943 e pelo Thiosemicarbazone em 1945. Esses medicamentos foram logo sucedidos pela descoberta da Estreptomicina, primeira droga efetiva contra o *Mycobacterium*, e pela Isoniazida e pela Rifampicina, primeiras drogas orais para manejo da doença. Com isso nascia uma nova era na terapêutica da tuberculose, permitindo e tornando possível a implantação de políticas públicas realmente eficientes no controle da disseminação infecciosa, e mudando a abordagem da doença para uma visão curativa do processo de adoecimento pela tuberculose.²

Acompanhando a série de avanços tecnológicos sociais e científicos, as taxas de mortalidade da tuberculose na Europa e na América do Norte iniciaram um declínio no início do século XIX. Avanços sociais, nutricionais e de moradia da população aliados a seleção imunológica de indivíduos resistentes à micobactéria tiveram papel importante, porém não único, na queda das taxas de quadros sintomáticos e fatais da doença. Este processo continuou até o presente, grandemente afetado pela instituição de programas de saúde pública e pela utilização de novos tuberculostáticos.²

1.2. Conceito:

A tuberculose é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, isolado e cultivado em 1882 por Robert Koch, que proporciona uma doença infecciosa que compromete principalmente os pulmões, podendo entretanto, manifestar-se clinicamente de inúmeras maneiras e em diversos órgãos.¹

O agente é uma forma de transição entre eubactérias e actinomicetos, sendo constituído por bacilos imóveis, não capsulados, não esporulados e não formadores de colônias, de dimensões variando entre 0,2 e 0,6 por 1 a 10 micras. Raramente são corados pelo método de *Gram*, porém são considerados *Gram* positivos em virtude das propriedades

de sua parede celular. Formam agrupamentos característicos de ramos alongados e tortuosos, conhecidos como cordas, característica importante para a visualização e diferenciação do bacilo em análises microscópicas. ⁴

Apresenta um tempo de geração variando de três horas, para espécies de crescimento rápido, e 18 horas para espécies de crescimento lento, característica devida ao alto teor de lipídios presente em suas cápsulas (60% do seu peso seco). O patógeno cresce lentamente, tendo seu metabolismo voltado especialmente para a construção da cápsula que o protege de agentes químicos, podendo sobreviver durante semanas ou meses sobre objetos inanimados. Entretanto, é facilmente destruído por agentes físicos como calor e raios ultravioletas dos raios solares e de radiações ionizantes. Sua resistência à dessecação, à ação de álcool, ácido e antibióticos, se estabelece em virtude da constituição de sua parede, organizada por ácidos micólicos e lipídios, formando uma barreira hidrofóbica resistente. Por outro lado, a presença de alto teor lipídico da membrana, proporciona efeitos biológicos importantes tais como a propriedade do patógeno na indução da formação de granulomas nos tecidos parasitados. ⁴

De metabolismo aeróbico, tem tempo de duplicação em 18 a 48 horas, sendo um parasita intracelular facultativo, com preferência pela infecção de macrófagos. Podem permanecer em um estado de dormência sem se dividir, dificultando a erradicação da doença e propiciando, clinicamente, a recidiva de infecções antigas subclínicas. ¹

Considerado como o protótipo do *M. tuberculosis complex*, o *M. tuberculosis* faz parte de uma família composta ainda pelo *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum* e pelo *M. canetti*, fenotipicamente e genotipicamente similares, compartilhando cerca de 99% de seus genes e marcados pela presença nos genomas do fragmento IS6110. Aceita-se a teoria de que o bacilo epidêmico atual tenha evoluído de uma forma primitiva, o *M. canetti*, se desenvolvendo paralelamente com a forma infectante de animais, o *M. bovis*, sofrendo mutações que o fizeram mais apto a infectar e se disseminar em humanos. ⁵

Outras espécies de micobactérias, não pertencentes ao complexo do *M. tuberculosis*, são responsáveis por 10 a 30% das linhagens isoladas em laboratório, constituindo um grupo extremamente heterogêneo e de difícil caracterização, com diferentes níveis de patogenicidade. Não desempenham grande papel na disseminação da tuberculose, podendo raramente causar doença ativa em hospedeiros humanos, sendo as linhagens mais importantes constituídas pelo *M. leprae*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii* e *M. scrofulaceum*. ⁶

Podemos diferenciar os membros do complexo *M.tuberculosis* do restante dos integrantes do grupo, pela presença de sequências genéticas IS6110, IS1081 e *mpb70*, pela

ausência de crescimento a 45°C, e pela falta de pigmentação das colônias. Além disso, é somente no primeiro grupo que constatamos o não crescimento em meios contendo 500g/ml p-nitrobenzoato, 5% cloreto de sódio, catalase termoestável e arilsulfatase. ⁴

Contendo 4,4 Mb, o genoma do *M. tuberculosis* é rico em elementos de inserção, tais como o IS6110, sequências repetidas e famílias conservadas de multigenes. Grande parte de sua capacidade codificadora se traduz na produção de enzimas responsáveis pela formação de lipídios de sua parede micobacteriana. O genoma completo da cepa de referência da *M. tuberculosis*, a H37Rv, foi sequenciado em 1998, por colaboradores do instituto Pasteur. ⁴

Dependendo do parasitismo, o *M. tuberculosis*, não é encontrado livre na natureza, sendo transmitido principalmente por via aerógena. Sua infecção possui baixa morbidade, o que, aliado a seu crescimento lento, proporciona uma manifestação patológica de curso lento e crônico em indivíduos de baixa imunidade. Tem preferência pela colonização dos pulmões, já que sendo um aeróbico estrito encontra neste órgão melhores condições de crescimento e transmissão. Durante a infecção, o bacilo é exposto a diversos contextos ambientais, dependendo do estágio e da severidade da doença, possuindo a capacidade de sobreviver em situações extremamente hostis para outras bactérias, como dentro do fagossomo de macrófagos. ¹

1.3. Prevalência:

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (cerca de 2,3 bilhões de pessoas), sendo a doença mais prevalente nos países subdesenvolvidos, onde entre 30% e 60% dos adultos estão infectados. Neste contexto, 8 a 10 milhões desenvolverão a doença durante a vida, sendo que cerca da metade apresentará formas contagiantes. O número de novos casos é estimado em cerca de 8,7 milhões, sendo 80% concentrado em 22 países subdesenvolvidos, entre eles o Brasil. O quadro completa-se com três milhões de óbitos conhecidos e determinados, anualmente, levando a OMS a estabelecer o cenário da tuberculose mundial em 1993 como de emergência global, sendo considerado “desastre da saúde pública”. ⁴

As principais causas de morte no mundo, atualmente, no grupo etário de 15 a 44 anos são, entre os homens, os acidentes de trânsito, em primeiro lugar, seguidos pela tuberculose, violência e suicídio. Entre as mulheres, a tuberculose está em primeiro lugar, matando mais que suicídio, guerras e hemorragias pós-parto. Em países em desenvolvimento, a tuberculose mata mais que todas as outras doenças infecto-contagiosas juntas, incluindo a Aids. Tudo isso

se agrava ainda mais pela perspectiva de que, caso o cenário mundial da doença não se reverta, teme-se que até 2020, um bilhão de pessoas sejam infectadas, 200 milhões adoeçam e 35 milhões possam morrer.^{1,7}

A tuberculose afeta com maior frequência os grupamentos urbanos com piores condições socioeconômicas, com grande superioridade numérica relativa de casos nos países pobres, onde se observa uma diferença de incidência entre pobres e ricos de até sete vezes. Dentro dessa distribuição da doença encontramos estatística bastante esclarecedora referente à comparação entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos: 21% dos infectados (382.000) no primeiro mundo contra 79% (1.328.000.000) no terceiro; 5% dos novos casos contra 95%; coeficientes de mortalidade variando de 23 a 2/100.000 contra 171 a 60/100.00; e 40.000(1,3%) dos óbitos anuais *versus* 2.960.000(98,7). Além disso, constatamos faixas etárias de maior prevalência diferenciadas entre países de primeiro e terceiro mundo, com a maior parte dos doentes na faixa acima de 50 anos nos primeiros, e entre 15 e 59 anos nos últimos, revelando o prejuízo socioeconômico que a tuberculose provoca na população economicamente ativa do mundo pobre.¹

A distribuição da doença entre os países deixa ainda mais clara a correlação entre o desenvolvimento e a proliferação do *Mycobacterium* dentro dos nichos populacionais de pobreza ou até miséria humana. Nos vinte e dois países de maior carga de tuberculose, a estimativa é de 6.910.000 casos, onde a Índia é líder com 1.856.000 novos casos anuais. O Brasil ocupa a 15ª posição com 116.000 casos e o Afeganistão ocupa o 22º com 70.000. Entretanto, a distribuição neste grupo sofre uma mudança quando classifica-se estes países quanto ao coeficiente de incidência, com a nova distribuição colocando o Zimbábue na liderança do grupo, com 584 casos/1000 habitantes, e o Brasil na 22ª posição com 68 casos/10000 habitantes.⁷

A tuberculose pode ser designada, sem correr riscos de pecar por exageros, como um problema social. Tal fato é bastante óbvio quando analisamos o contexto onde esta doença se desenvolve com maior voracidade e provoca os maiores prejuízos socioeconômicos. Com isso, fatores como renda familiar baixa, educação precária, habitação miserável, famílias numerosas, adensamentos populacionais, desnutrição alimentar, alcoolismo, doenças infecciosas associadas, dificuldade no acesso aos serviços de saúde e fragilidade da assistência social são determinantes em caracterizar os bolsões de pobreza onde caracteristicamente encontramos as maiores incidências e prevalências da doença.⁴

Diferentemente do que se imaginou nas últimas décadas, a conquista de medicamentos quimioterápicos mais potentes não trouxe o controle efetivo da doença. Em contrapartida,

houve uma exacerbação da disseminação da tuberculose em todo o mundo, facilitada principalmente pela pandemia do HIV, pela ampliação da miséria das populações mais desfavorecidas em contraste do aumento da longevidade nas mais desenvolvidas; fatores que comprometem a imunidade. É outro erro acreditar que a tuberculose reemergiu no mundo com advento da epidemia do HIV. Nos países pobres as taxas de infectados pela micobactéria nunca chegaram a diminuir, logo, não houve um recrudescimento da tuberculose nas nações em desenvolvimento, e sim somente uma piora de um quadro já permanente nesses contingentes populacionais. Estima-se que a taxa de co-infecção entre HIV e o bacilo da tuberculose esteja entre 30 a 60% em muitos países da América Latina, África e em algumas populações de países desenvolvidos.¹

Segundo os dados da OMS, a tuberculose e a Aids juntas constituem, na atualidade uma calamidade sem precedentes na história. O estado de imunossupressão determinado pela Aids estabelece uma condição favorável tanto para o contágio como para o adoecimento. Logo, a evolução do estado de infecção para o de manifestação clínica da tuberculose é muito diferente entre o indivíduo imunocompetente e àquele infectado pelo HIV. Nesse contexto, a chance de que a infecção pelo bacilo evolua para doença tuberculosa em imunocompetentes é de 10% ao longo de sua vida, enquanto chega a ser de 10% ao ano em infectados pelo HIV. Além disso é importante destacar que a tuberculose é a mais prevenível, curável e transmissível de todas as infecções que acompanham a infecção pelo HIV, sendo a única doença contagiosa que também é infectante e que pode ser transmitida a indivíduos soronegativos.⁴

No Brasil, o Ministério da Saúde estima anualmente uma prevalência de 68 casos/100.000 habitantes, com cerca de 111.000 casos novos, um coeficiente de incidência de 47,2/100.000 e 6.000 óbitos, com maior concentração entre as faixas etárias entre 20 e 49 anos. Esses números variam de acordo com os diferentes estados da União, onde temos valores de incidências variando de 29,6/100.000 na região Centro-Oeste, para 53,1/100.000 nas regiões Nordeste e Sudeste. Nesse cenário, ao considerarmos os números de taxa de incidência por 100.000 habitantes, nosso país encontra-se ranqueado na 92ª posição mundial, entretanto, há uma clara tendência de diminuição dos níveis de incidência no país durante o decorrer destas últimas décadas, com queda dos números de 53/100.000 em 1990 para 48/100.000 no ano de 2002.¹

A mortalidade pela tuberculose é calculada pelo coeficiente entre o número de mortes causadas pela doença/população x 100.000, fornecendo informações úteis a respeito do perfil epidemiológico da população que morre por tuberculose, e se são casos novos, recidivas ou

casos crônicos. A morte nos dias de hoje pela tuberculose é decorrente principalmente de um diagnóstico tardio da doença, portanto, a morte de um novo caso ou recidiva da doença deveria ser excepcional.¹⁰

Nas Américas estima-se que ocorram 40 a 50 mil óbitos anuais, sendo o Brasil o líder de mortes em números absolutos. Os números analisados pela Organização Panamericana de Saúde mostram, porém, que Peru e Equador são os países que apresentam as maiores taxas de mortalidade do continente, enquanto as menores, por outro lado, são verificadas nos EUA, Canadá e Cuba.^{4,7}

Já no nosso país, onde a taxa de mortalidade é de 3,8/100.000 habitantes, ocorre uma distribuição muito similar à da prevalência da doença, com dados coletados para o ano de 1998 mostrando um total de 6.029 mortes, sendo 3.107 no sudeste, 1.688 no nordeste, 653 no sul, 313 no norte e 268 no centro-oeste. O estado com menor taxa de mortalidade foi Santa Catarina com 1,42/100.000 habitantes, enquanto o Rio de Janeiro apresentou as maiores taxas com 8,2 mortes/100.000 habitantes.^{4,7}

A incidência da doença no Brasil em 1998 foi de 82.931 novos casos, correspondendo a um coeficiente de incidência de 51,3 a cada 100.000 habitantes, envolvendo casos pulmonares positivos ao exame direto do escarro (26,6/100.000), casos pulmonares sem confirmação bacteriológica (17,1/100.000) e casos de formas extra-pulmonares (7,3/100.000). As faixas etárias mais atingidas foram as acima de 20 anos, o que nos indica uma alta taxa de casos decorridos de infecção recente.⁴

Em Santa Catarina, dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), em 2007, encontraram incidência de 27 casos de tuberculose por 100.000 habitantes. De todos os casos descritos, 79% deles apresentaram forma pulmonar, 47,7% eram bacilíferos, 70% deles se encontravam na faixa etária de 20 a 50 anos, 55% eram da raça branca, 64% deles apresentavam escolaridade de 4 a 11 anos, 66% eram homens e 18% deles apresentavam coinfeção TB/HIV/SIDA.⁸

1.4 História da evolução e fisiopatologia da doença.

1.4.1. Transmissão:

A fonte da infecção habitual tem origem no indivíduo com a forma pulmonar da tuberculose, eliminando bacilos para o exterior. A capacidade do bacilo de se transmitir para outra pessoa a partir de um doente, é consequência do estado bacilífero do doente e da

intensidade do contato, em termos de proximidade, tempo, continuidade da exposição, e do contexto favorável do ambiente onde ele ocorre. Estima-se, por exemplo, que o tempo de exposição necessário para uma infecção bem sucedida seja entre 100 e 200 horas, dependendo da intensidade e da proximidade do contato.⁴

Calcula-se que durante um ano, em uma comunidade, uma fonte de infecção poderá infectar em média até 15 pessoas que tenham sido expostas ao contato com o doente. A fala, o espirro e principalmente a tosse de um doente com tuberculose pulmonar bacilífero lançam no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados, denominadas de gotículas de Flügge. As gotículas mais pesadas se depositam rapidamente no ambiente, enquanto as mais leves permanecem em suspensão no ar. Somente as gotículas desidratadas, com diâmetro de até 5 micra, contendo 1 a 2 bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos pulmonares, iniciando assim o processo infeccioso. As partículas infectantes são denominadas núcleos de Weels, que serão processadas pelo organismo de diferentes maneiras, dependendo do tamanho das mesmas. As partículas médias são, em sua maioria, retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios através do mecanismo muco-ciliar. Os bacilos assim removidos são deglutidos, inativados pelo suco gástrico e eliminados nas fezes. Já as partículas menores alcançam os alvéolos, onde o germe se implanta. Os patógenos depositados no ambiente normalmente se dispersam em aerossóis, não desempenhando papel importante na transmissão.⁹

As características da tosse e do indivíduo que expectora, interferem nas relações de comunicabilidade do bacilo entre o foco de transmissão, e o contato exposto. Pacientes apresentando melhor estado geral e nutricional tendem a apresentar tosse mais vigorosa, com maior poder de dispersão de partículas bacilíferas de maior capacidade de transmissão. A transmissão também é influenciada pelas propriedades físico-químicas da expectoração, tais como espessura e aderência.

Ainda nesse contexto, observa-se que a vigência de tratamento interfere no contágio, uma vez que, em pacientes submetidos ao tratamento com tuberculostáticos, ocorre a expectoração, tanto do bacilo como do medicamento. Além disso, os medicamentos interferem na sobrevivência e na proliferação dos bacilos presentes nas gotículas expectoradas e posteriormente ressecadas e em suspensão no ambiente. Durante muito tempo acreditou-se que após 15 dias da vigência de tratamento combinado com tuberculostáticos, já não havia mais transmissão pelo paciente. Este último conceito, atualmente, foi aprimorado, de forma que, caso o paciente não apresente história de tratamento anterior ou outros riscos conhecidos de resistência, considera-se que após 15 dias de tratamento, havendo melhora do quadro

clínico, o paciente passa a ser considerado como não infectante. Entretanto, visto a existência de bacilos resistentes às drogas de primeira escolha, é recomendado que a não infectividade do paciente em tratamento seja comprovada pelo status de paucibacilífero através da baciloscopia negativa do escarro. ^{1,10}

1.4.2. História natural da tuberculose:

A história natural da tuberculose demonstra que a maioria dos indivíduos é resistente à infecção, sendo competentes na elaboração de respostas imunológicas contra o *M. tuberculosis*, mas insuficientes na esterilização completa do patógeno invasor. Nesse contexto, dos indivíduos expostos ao bacilo, somente 10 a 30% se tornam infectados, ocorrendo manifestação da tuberculose ativa em apenas 5 a 10% deles. Ocorre, no entanto, que muitos indivíduos podem apresentar um estado de déficit imunológico frente a antígenos específicos do bacilo, favorecendo a proliferação acelerada do agente e estabelecendo a doença. Logo, o desenvolvimento da tuberculose no indivíduo infectado depende de fatores ligados ao bacilo e ao hospedeiro. Através da fórmula proposta por Rich, concluímos que o desenvolvimento da doença é diretamente proporcional ao número de bacilos, à virulência da cepa inalada, e ao desenvolvimento de hipersensibilidade do hospedeiro. ¹¹

Após a inalação do bacilo, uma série de barreiras mecânicas inespecíficas atuará contra a infecção. Pêlos nasais, a angulação das vias aéreas, o turbilhonamento aéreo, a secreção traqueobrônquica, e principalmente o clearance muco ciliar, são os principais elementos que impedem o bacilo de adentrar nos alvéolos pulmonares do contato exposto. ⁴

O *Mycobacterium*, ao superar as barreiras físicas do trato respiratório alto e entrar no ambiente pulmonar alveolar, recebe o confronto de macrófagos, células integrantes da imunidade inata local. Os macrófagos residentes no tecido, após fagocitarem o bacilo produzindo o fagossomo, fundem a vesícula formada aos lisossomos, podendo ocorrer já nesta instância o processamento de antígenos, e a posterior apresentação dos últimos aos linfócitos T auxiliares, através do complexo principal de histo-compatibilidade de classe II. No processo de fagocitose, são produzidas citocinas e quimiocinas, que sinalizam ao sistema imune a presença do patógeno, provocando o recrutamento e a migração de neutrófilos, monócitos e linfócitos para o local de infecção. No entanto, devido a mecanismos de resistência próprios dos bacilos da tuberculose, não há sucesso no extermínio do patógeno. É através da inibição da fusão do lisossomo ao fagossomo gerado durante a ação macrofagocitária, que a micobactéria sobrevive durante todo esse período de mobilização

imunológica do hospedeiro, provocando a morte da célula fagocitária e prosseguindo com sua multiplicação extra-celular.¹²

No caso dos mecanismos de defesa descritos acima falharem na depuração dos bacilos infectantes, pode ocorrer progressão do processo inflamatório e desenvolvimento de uma pneumonia inespecífica. Neste novo ambiente inflamatório, o *Mycobacterium* começa a proliferar, aproveitando-se da ausência de uma resposta imunológica específica que somente irá se desenvolver no período que vai de quinze a vinte dias a partir da infecção. Com isso, ao final de quinze dias podemos encontrar até 10^5 bacilos no foco primário de infecção, podendo ocorrer, de maneira concomitante, a disseminação da doença por via linfática e ou hematogênica para outros órgãos.⁴

O foco pulmonar formado agora no processo infeccioso, denominado de complexo de Ghon, possui medidas de 1 a 2 mm, apresentando consistência amolecida, e se desenvolvendo em um espaço de tempo de 3 a 4 semanas, durante o qual ocorre o desenvolvimento da imunidade celular, com a conseqüente viragem do teste tuberculínico. Este período que envolve desde a penetração do bacilo no ambiente pulmonar até a viragem do teste tuberculínico é chamado de período pré-alérgico.⁴

Simultaneamente ao fenômeno fagocitário, células dendríticas com o *M. tuberculosis* em seu interior migram para os linfonodos regionais, ativando linfócitos CD4 e CD8 locais, que migram para o foco de infecção, guiados pelas quimiocinas produzidas pelas células infectadas. O acúmulo de linfócitos ativados, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais, dentre outras; lideram a formação do granuloma que envolve o bacilo em um ambiente hipóxico e insalubre, limitando sua disseminação, e formam um micro contexto onde os integrantes desta resposta imune interagem com objetivo de eliminar o patógeno invasor, propiciando a contenção do foco infeccioso.¹²

O complexo formado por foco pulmonar, linfangite e um foco ganglionar é chamado de complexo de Ranke. Neste momento de disseminação hematogênica o organismo imunologicamente competente já tendo desenvolvido a imunidade adquirida, impede o avanço do processo infeccioso em 95% dos casos, encerrando assim a primoinfecção.⁴

Algumas micobactérias resistentes, entretanto, conseguem sobreviver neste ambiente de agressão criado dentro dos granulomas, entrando em estado de dormência, e evitando assim, a eliminação pelo sistema imune do hospedeiro. Cabe lembrar também, que existem diferentes granulomas formados nos diferentes hospedeiros, que proporcionam distintas taxas de eliminação dos patógenos infectantes. Com isso, a micobactéria no estado de dormência

pode habitar o ambiente do interior do granuloma durante toda a vida do hospedeiro, ressurgindo em sua forma ativa quando presente algum contexto de imunossupressão.¹²

No contexto de proteção ao bacilo da tuberculose, o estudo de diferentes populações linfocitárias mostrou o papel fundamental do linfócito TCD8⁺ no combate inicial ao bacilo e na prevenção da primoinfecção. Desse modo, os linfócitos TCD8⁺ estimulados por antígenos endógenos micobacterianos liberados na circulação durante a infecção, têm a capacidade de destruir células infectadas pelo *Mycobacterium*, permitindo a eliminação dos mesmos e constituindo em um dos principais mecanismos de defesa. Por outro lado, a imunidade humoral parece ter pouco valor no combate da doença, uma vez que os anticorpos secretados por plasmócitos, não tem a capacidade de penetrar nos macrófagos infectados.⁴

Neste período de primoinfecção, encontramos em 95% dos casos a resolução do processo infeccioso com a formação de calcificação ou fibrose do complexo de Ghon, muitas vezes detectada em exames radiográficos simples de tórax. Por outro lado, caso o foco infeccioso não seja contido, fato presente em apenas 5% dos casos, ou por incompetência da imunidade celular do hospedeiro, ou por características de virulência, resistência ou carga do bacilo infectante, pode ocorrer liquefação do cáseo granulomatoso, e desenvolvimento de doença pulmonar. A esta fisiopatologia decorrente do desenvolvimento da tuberculose a partir do complexo pulmonar primário, desenvolvida nos primeiros cinco anos após a primoinfecção, denominamos tuberculose primária. Esta última também pode manifestar-se em vários padrões de doença, apresentando manifestações ganglionares, ganglionares-pneumônicas, bronco-pneumônicas, cavitárias, atelectásicas, ou até miliares, forma mais grave da tuberculose primária, resultante da disseminação de lesões granulomatosas muito pequenas atingido órgãos em todo o corpo. Cabe lembrar ainda, que o curso da tuberculose primária normalmente se dá de maneira insidiosa e com quadro clínico arrastado e lento (forma mais comum em adultos), porém pode manifestar-se de maneira insidiosa, normalmente em crianças.⁴

Passados anos do estabelecimento da lesão primária podemos observar a manifestação de outra forma da tuberculose, denominada de tuberculose pós-primária. Nesta, a doença manifesta-se tardiamente ao momento da infecção inicial, e o indivíduo já apresenta memória imunológica para os antígenos, manifestando quadro clínico mais arrastado, lesão circunscrita com o desenvolvimento de cavitações, e maior processo fibrótico associado a uma maior reação de hipersensibilidade. A doença pode ter origem a partir de um novo foco de infecção exógena por cepas mais virulentas ou resistentes, ou pode ter origem na reativação de um foco quiescente de bacilos que se encontravam inativos metabolicamente. A reativação do foco se

dá com a formação de granulomas, principalmente em ápice pulmonar, evoluindo para necrose de caseificação e para doença. A drenagem do cáseo para um brônquio pode levar a disseminação bronco-gênica, formando uma caverna tuberculosa no local de drenagem. Essa nova disseminação pode evoluir em nova cura do quadro ou em complicações associadas à nova invasão, decorridas da própria destruição do parênquima pulmonar, ou pela invasão de outras estruturas adjacentes como na formação de aneurismas infecciosos da artéria brônquica, conhecidos como aneurisma de Rasmussen.^{4,12}

A análise do processo fisiopatológico das formas de disseminação da tuberculose de origem pulmonar para estruturas adjacentes mediastinais, ou para o restante do corpo, nos fornece quatro vias principais: a via linfohematogênica, a via hematogênia estabelecida após ruptura da lesão diretamente no vaso, por contiguidade às estruturas mediastinais adjacentes, e finalmente por mecanismo intra-canalicular por saída do material caseoso por óstios e canais.

4

1.5. Quadro clínico e diagnóstico:

A tuberculose normalmente se apresenta como uma doença de curso subagudo ou crônico, proporcionando aos doentes manifestações de sintomatologia indolente, de intensidade crescente, com períodos de remissão e bem estar. Logo, é comum a demora na procura por assistência médica, com 66% dos acometidos levando uma média de três meses para entrarem em contato com algum serviço de saúde. Dentre a diversidade sintomatológica que pode ser manifestada durante a infecção, certos sinais e sintomas são mais comumente referidos pelo paciente, e observado pelos cuidadores. Logo, quadros envolvendo tosse, hemoptise, dispneia, dor torácica, rouquidão, febre, sudorese, perda ponderal, são parte importante e clássica da imensa gama de manifestações dessa doença. É fundamental lembrar, entretanto, que pode existir ampla sintomatologia inespecífica da doença, dependente do órgão acometido pelo bacilo.¹

A tosse está presente em praticamente todos os pacientes, sendo menos comum na forma pleural da doença, resultando do estímulo inflamatório alveolar ou pelo comprometimento granulomatoso das vias aéreas. Pode se apresentar de inúmeras maneiras, inicialmente com tosse seca, evoluindo para produtiva com expectoração mucosa ou purulenta, geralmente em pequena quantidade e ocasionalmente associada à hemoptise. Pode às vezes manifestar-se como uma mudança no padrão de tosse crônica de tabagista, que normalmente não valorizam a sintomatologia por já estarem acostumados a sua presença de

maneira crônica. É fundamental sempre suspeitar do diagnóstico da tuberculose em pacientes que apresentarem tosse produtiva persistente por período maior que três semanas.¹

A hemoptise não é uma sintomatologia obrigatoriamente presente, podendo se manifestar com sangramentos variáveis, apresentando-se na presença de estrias sanguíneas misturadas ao escarro (hemoptoicos) ou até como hemoptise maciça, geralmente rara e associada à existência de aneurismas de Rasmussen. É possível, por outro lado, que a hemoptise ocorra até mesmo em pequenas lesões, podendo até ser a sintomatologia de deflagração da doença, durante a formação das cavidades parenquimatosas.¹

A dispneia também é uma sintomatologia pouco comum, devido a aspectos específicos da fisiopatologia da ação do *Mycobacterium* no parênquima pulmonar. A destruição difusa do tecido pulmonar pelo processo inflamatório, envolvendo o ambiente alveolar e a vascularização adjacente, não provoca mudanças expressivas na relação de ventilação/perfusão local. A situação já toma outra configuração em inúmeros outros contextos específicos no desenvolvimento da doença. Atelectasias, grandes cavitações, o padrão miliar, as lesões de grande acometimento inflamatório agudo, o desenvolvimento de pneumotórax, derrame pleural e as lesões avançadas da doença, em consequência ao padrão fibrótico restritivo estabelecido, estabelecem a dispneia como manifestação importante do quadro.¹

A dor torácica de pequena intensidade, sintomatologia bastante frequente, está relacionada ao acometimento pleural. Pode ocorrer já no início do adoecimento do indivíduo, devido à proximidade do alvéolo, sítio inicial de acometimento infeccioso, à superfície pleural.¹

A rouquidão, associada às formas da doença pulmonar com comprometimento de laringe, quase sempre passa despercebida pelo paciente, sendo raramente relatada e somente bastante valorizada quando os demais sinais e sintomas se encontram ausentes.¹

Partindo da análise da fisiopatologia da multiplicação do *Mycobacterium*, observamos uma maior multiplicação bacilar, intra e extra-fagocitária, nos períodos de pico de produção de cortisol pela glândula adrenal, no período entre as 11 e 12 horas. Concomitantemente à multiplicação lenta do patógeno, ocorre também morte e ruptura do macrófago infectado, com a liberação de seu conteúdo inflamatório no parênquima pulmonar nas horas que se seguem, levando a um processo inflamatório local e, conseqüentemente a uma resposta sistêmica do hospedeiro manifestada como febre. Daí a característica febre vespertina, entre as 17 e 21 horas, encontrada nos doentes com tuberculose, e a sudorese noturna intensa, após os picos febris, como mecanismo corporal compensatório ao aumento da temperatura corporal. Esta

febre, no entanto, se manifesta com temperaturas não muito altas, fato explicado pela multiplicação lenta e insidiosa do bacilo e associadamente, ao processo inflamatório local de pequena intensidade.¹

O contexto inflamatório crônico estabelecido pela infecção insidiosa do *Mycobacterium* pode provocar uma síndrome consumptiva, proporcional ao tempo de duração e extensão da doença, exteriorizada como perda ponderal, anorexia, adinamia, artralguas e mialgias. Nesse cenário, pacientes já envolvidos em patologias depletoras do sistema imunológico, como AIDS, alcoolismo, desnutrição, drogadição, acabam por apresentar intensa deterioração nutricional, com a consequente exacerbação do quadro infeccioso e piora de seu prognóstico.¹

Os achados ao exame físico são proporcionais à extensão do processo infeccioso, ao tempo de duração da doença e ao local acometido pelo bacilo. Especificamente, no contexto de doença pulmonar, podemos encontrar estertores na região das lesões granulomatosas, geralmente apicais e posteriores. Sibilos e roncos também podem estar presentes no caso de comprometimento brônquico. Nas formas de pneumonia caseosa, pode ocorrer diminuição do murmúrio vesicular, e broncofonia quando o derrame pleural está presente, além do clássico sopro anfórico nas cavidades tuberculosas. A hipersensibilidade ao bacilo ou aos seus componentes, presente comumente no decorrer da primoinfecção, pode manifestar-se com achados de eritema nodoso, ceratoconjuntivite flictenular, polisserosite e eritema endureado.¹

Novamente cabe destacar que toda a sintomatologia descrita anteriormente, embora clássica e sugestiva no diagnóstico da tuberculose, pode ocorrer em uma gama de outras patologias infecciosas, neoplásicas ou inflamatórias, de maneira bastante inespecífica. Logo, a investigação diagnóstica deve levar em conta os inúmeros diagnósticos diferenciados presentes, e ser confirmado com exames complementares.

1.5.1. Exames complementares:

Frente a um conjunto de evidências clínicas, epidemiológicas e sociais que apontem para o diagnóstico da tuberculose, podemos fazer o uso de uma gama de exames complementares para confirmação da hipótese diagnóstica inicialmente elaborada. Por ser uma doença infecciosa, a confirmação diagnóstica se dá pela identificação do BK em material oriundo da lesão. Seguindo essa premissa, os testes de confirmação a serem escolhidos dependerão da sensibilidade, da especificidade, e da aplicabilidade do exame ao contexto ao qual doente e o cuidador de saúde estão inseridos. Os exames utilizados na investigação

diagnóstica da tuberculose podem ser: bacteriológicos, bioquímicos, citológicos, radiológicos, histopatológicos, imunológicos e àqueles baseados na biologia molecular.⁴

A suspeita diagnóstica é fundamental para que ações específicas sejam tomadas envolvendo o doente. Com isso, a implantação de um diagnóstico rápido, o isolamento do paciente internado com a suspeita de forma pulmonar da doença, o início precoce de tratamento, a proteção da equipe de saúde envolvida no processo e de outros pacientes internados na instituição, e a análise dos contatos domiciliares, são medidas obrigatórias e protocoladas nos principais centros de saúde de atendimento.¹³

Para início de investigação do paciente suspeito, deve ser solicitada uma radiografia de tórax, e devem ser coletadas três amostras de escarro em dias sucessivos, de preferência pela manhã, uma vez que as secreções pulmonares se acumulam nas vias aéreas durante a noite. No primeiro dia, o paciente fornece uma amostra imediata sob supervisão, no momento em que se apresenta ao local de atendimento. Nos próximos dois dias, pela manhã, novas amostras de escarro são coletadas. Nos pacientes sem expectoração, porém com radiografia de tórax sugestiva de tuberculose, a indução do escarro com solução salina hipertônica está indicada. Todas as amostras serão submetidas à baciloscopia e à cultura do escarro, ambos os procedimentos de primeira linha diagnóstica na tuberculose.¹⁴

Dentre os exames utilizados, é o exame bacteriológico o que permite inicialmente a suspeita e logo a confirmação do diagnóstico final através da cultura. Pode ser realizado tanto pelo exame direto do escarro, método não confirmatório, como após a cultura do mesmo em meios de cultura específicos para o cultivo do *Mycobacterium tuberculosis*. O exame direto é o mais empregado na rotina dos centros de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS) nacional, sendo escolhido pela sua simplicidade, rapidez e baixo custo. É realizada através da microscopia do escarro, onde o material coletado do paciente é corado com uma técnica específica para o BK denominada de coloração de Ziehl-Neelsen. Este método, no entanto, somente fornece resultados positivos quando há grande número de micobactérias no material examinado (pelo menos 5000 bacilos por ml de amostra). Os germes álcool ácido resistentes, com a coloração de Ziehl-Neelsen, apresentam-se como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, mais ou menos granulados e corados de vermelho em um fundo azul. Somente 50 a 70 % dos doentes com lesão pulmonar são positivos à bacterioscopia.¹⁵

A cultura do escarro, padrão áureo para a identificação do bacilo, permite a identificação do bacilo encontrado e requer menor número de bacilos por ml de amostra do material examinado para ser positiva, possibilitando o diagnóstico de lesões iniciais e paucibacilares. Constitui o método mais sensível de identificação do bacilo, detectando 70 a

80% dos casos. O resultado pode tardar de quinze a sessenta dias, sendo esta a sua principal desvantagem, que por outro lado, avalia também o tipo e a sensibilidade da micobactéria aos quimioterápicos. O meio ideal para cultivo do escarro e desenvolvimento da cultura diagnóstica deve ser econômico, de fácil preparo, e capaz de inibir o crescimento de outros organismos competidores. Existem vários meios capazes de cultivar o bacilo, classificados em três grupos: meio a base de ovo, meios a base de ágar e meios líquidos. Os meios sólidos de cultivo a base de ovo são considerados os de primeira escolha em virtude de sua praticidade e de seu custo, tendo como principais integrantes o Löwestein-Jensen (LJ), Ogawa e Petragani. Os meios a base de ágar são mais caros, de difícil preparo e exigem o uso de antimicrobianos inibitórios ao crescimento de outros microorganismos que não a micobactéria, estando disponíveis comercialmente o Middlebrook 7H10 e o 7H11. Já os meios líquidos como o Herman Kirchner, 7H9 e 7H12 de Middlebrook, são mais enriquecidos que os sólidos e por isso mais indicados em amostras com pequena quantidade de bacilos, tais como sangue, líquido cefalorraquidiano e amostras de tecidos macerados. Dentre toda essa diversidade de escolha para meios de cultivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece e recomenda os meios a base de ovo como padrão de referência para o diagnóstico da TB.^{4,16}

1.5.2. PCR:

Ao cogitarmos a utilização de qualquer método laboratorial, que se baseie em técnicas de biologia molecular, na complementação da rotina diagnóstica de alguma condição patológica, devemos inicialmente refletir sobre alguns aspectos importantes. Qual o patógeno a ser investigado? Em qual tipo de espécime clínico? Quais são os métodos de investigação que já existem para o diagnóstico da doença? Já existe algum teste ou método com altas sensibilidade e especificidade que satisfaça as necessidades diagnósticas presentes?¹⁷

No caso da Tuberculose, a detecção do *M. tuberculosis* no escarro, possui técnicas de cultivo com sensibilidade aquém do ideal, requisitando longos períodos de incubação do bacilo e proporcionando, conseqüentemente, uma lentificação ou atraso no diagnóstico da doença.¹⁷

Nesse contexto, se vê como necessária a maior investigação de novos métodos que, através da utilização da biologia molecular, possam suprir essas demandas, proporcionando um encurtamento temporal e uma otimização do diagnóstico da tuberculose.¹⁷

A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) é uma metodologia laboratorial, realizada totalmente *in vitro*, que possibilita a síntese de fragmentos de DNA, através da utilização da

enzima DNA-polimerase. Esta enzima, presente no processo de replicação do DNA das células dos organismos vivos, sintetiza uma sequência complementar de uma curta região de nucleotídeos de um gene de um DNA alvo. Para isso, deve existir, como reagente da reação, um pequeno fragmento de oligonucleotídeos servindo como molde “iniciador” (denominado no seu termo em inglês *primer*) já ligado a uma das cadeias de DNA na curta região específica escolhida para o início da síntese. Logo, os *primers* escolhidos pelo examinador determinam a sequência a ser amplificada resultando na síntese de uma sequência específica de DNA e seus bilhões de cópias. Através deste método, portanto, é possível amplificar de maneira quantitativa qualquer amostra de DNA desejada, de maneira independente, teoricamente, da quantidade inicial da mesma.¹⁸

O processo inicia com a seleção e a purificação de uma amostra de DNA da qual se deseja amplificar uma sequência de nucleotídeos de fita dupla ou simples. Para realização da reação também são necessários dois *primers* (oligonucleotídeos) que correspondam à sequência de DNA alvo a ser amplificada, DNTP's (os quatro pares de bases nitrogenadas), um termociclador (fonte de calor e controle de temperatura da reação), uma enzima polimerase que se mantenha estável em altas temperaturas, e íons de magnésio solubilizados na forma de um tampão.¹⁹

A reação ocorre através de ciclos de mudança na temperatura da solução, promovidas por um equipamento denominado termociclador. Altas temperaturas (95°) são utilizadas para separar as duplas hélices do DNA, seguidas de uma rápida redução da temperatura que permite a hibridização dos *primers* com os sítios específicos do DNA alvo, e uma nova redução da temperatura a um nível ótimo, permitindo que a enzima polimerase incorpore ao complexo DNA-*primer*, os nucleotídeos presentes na solução, formando assim cópias da sequência específica desejada. As reações de PCR se fazem de maneira exponencial, sendo que, em uma reação de 35 ciclos, por exemplo, podemos ter como resultado, a síntese de 68 bilhões de cópias (amplicons) da região desejada do gene.¹⁹

Os testes de amplificação de nucleotídeos podem ser divididos em testes *in house* e testes de kits comerciais, dependendo do local onde são desenvolvidos, e ao propósito para o qual são destinados. Os testes *in house* são aqueles desenvolvidos e padronizados em centros de pesquisa, diferindo em relação às preparações das amostras, os alvos genéticos utilizados e os protocolos estabelecidos em cada laboratório. Por outro lado, os kits comerciais são produzidos em larga escala de maneira idêntica e padronizados, seguindo os mesmos protocolos, gerando testes invariavelmente com resultados mais facilmente reprodutíveis.²⁰

Os testes *in house* apresentam custos mais baixos quando comparados aos testes comerciais, entretanto, suas estimativas de acurácia são muito heterogêneas, devendo ser padronizados e validados, em cada centro de pesquisa, para que possam ser utilizados na rotina diagnóstica de algum laboratório. A maior parte dos testes *in house* utilizam a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na amplificação de nucleotídeos através da utilização de uma ampla gama de sequências utilizadas como alvo genético (*primers*). Nesse contexto, os testes *in house* podem diferir entre si em três fatores: região de amplificação, preparo da amostra e na detecção dos fragmentos amplificados.²⁰

Dentro das diferentes regiões de amplificação estão o gene que codifica a proteína MPB 64, a proteína de choque térmico de 65 kDa, a proteína antigênica de 38 kDa e a sequência de inserção IS6110. Esta última é um elemento genético de 1350 pares de bases encontrado exclusivamente no complexo *M. tuberculosis*, em diferentes números de cópias, e integrados em vários sítios cromossômicos. É exatamente por ser uma sequência repetitiva no genoma do *M. tuberculosis*, que esse alvo genético propicia um aumento na sensibilidade da PCR quando comparada com a amplificação de sequências únicas do DNA. Por essa razão, o IS6110 se estabeleceu como a sequência mais comumente utilizada para a amplificação do bacilo da tuberculose, apresentando sensibilidade de até 90% e especificidade de 97% em amostras de lavados broncoalveolares provenientes de pacientes com suspeita de TB paucibacilar, além de sensibilidade de 72% e especificidade de 95% em escarros induzidos.^{20,21}

A escolha da sequência IS6110, entretanto, possui a desvantagem de não estar presente em vários isolados de *M. tuberculosis* que a perderam de seu genoma. Tais cepas podem ser observadas principalmente na Ásia, sendo encontradas porém, em muitas outras regiões do globo. Nesse contexto, outro alvo molecular utilizado é o gene 16S do RNA ribossômico (rRNA), altamente conservado no gênero *Mycobacterium sp.*, e onde podem ser encontradas diferenças na sequência de nucleotídeos específicas para um complexo ou espécie, sendo, por isso utilizado como alvo de amplificação para identificação da espécie de micobactéria.^{23,24,25,26}

Com essas informações, podemos já esperar, apoiados pela constatação empírica laboratorial, que a PCR IS6110 apresente maior sensibilidade que a PCR 16S rRNA. Fato já esperado, uma vez que a sequência de inserção IS6110 está presente em até 20 cópias no genoma do *M. tuberculosis*, enquanto o gene 16S rRNA está presente em apenas uma única cópia. Todavia, considerando um ambiente de pesquisa, onde é realizado o diagnóstico laboratorial de doenças provocadas por micobactérias, é interessante utilizar o gene 16 rRNA,

conservado no gênero *Mycobacterium sp.*, partindo do pressuposto de que podem haver cepas coletadas onde a sequência IS6110 não está mais presente. Cabe ressaltar também, que ainda existe a possibilidade que o material coletado dos pacientes infectados, possa conter micobactérias não tuberculosas, as quais podem ser detectadas pela PCR 16S rRNA.^{22,23}

A preparação da amostra clínica para a análise *in vitro* é um fator de grande importância no sucesso da PCR, influenciando principalmente na sensibilidade da reação. Logo, a extração do DNA do material a ser utilizado deve ser realizada de maneira a propiciar um ótimo aproveitamento de todo material genético nele contido. Para isso, são vários os métodos disponíveis. Podem ser utilizadas altas temperaturas, tampões de lise, fenol/clorofórmio, partículas de sílica, sacarose e partículas de vidro ou ultrassom para rompimento da parede celular. Dentre os inúmeros tampões utilizados, podemos citar aqueles contendo Dodecil Sulfato de Sódio, Tween 20 e Tiocionato de Guanidina.²⁷

A detecção do produto da PCR pode ser realizada através do método de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, gel de poliacrilamida, ou hibridização utilizando biotina ou digoxigenina incorporadas às moléculas de DNA.^{28,29,30,32}

Existe uma grande variabilidade na sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos utilizados nos testes *in-house* utilizando PCR para detecção biomolecular do *Mycobacterium*. Revisões qualitativas tem analisado as diferentes metodologias e justificado essas diferenças como decorrentes dos diferentes processos descontaminação das amostras, das possíveis contaminações cruzadas, da presença de fatores inibitórios da PCR, do erro da amostragem, da qualidade do padrão áureo, da análise de amostras respiratórias e não respiratórias, e do limite de detecção considerado em cada procedimento de amplificação. Logo, para que a técnica biomolecular tenha sucesso no diagnóstico da tuberculose, é necessário um controle rigoroso das diferentes etapas da metodologia, a fim de evitar a presença de falso-positivos e falso-negativos. Inicialmente, é necessária a utilização de controles em todas as etapas do processo, com o objetivo de confirmar a obtenção adequada do DNA da amostra clínica, a eficácia da reação da PCR e a ausência de contaminações exógenas inerentes aos instrumentos de processamento ou aos substratos utilizados.³¹

Já os Kits comerciais, sendo testes produzidos em larga escala, seguindo padrões rígidos exigidos para sua comercialização, apresentam-se como produtos com maiores custos, porém com altas taxas de reprodutibilidade. Dentre os muitos produtos disponíveis no mercado, apenas três foram amplamente difundidos e avaliados: o Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct test, o Amplicor MTB e o BD ProbeTec ET, estando somente o segundo aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008).

Os testes AMTD e EMTD são baseados na amplificação mediada por transcrição reversa, e têm como alvo o RNA ribossômico (rRNA) 16S de uma região específica do complexo *M. tuberculosis*.²³

O Amplicor MTB test é baseado na PCR do gene rRNA 16S do gene *Mycobacterium*. Para reduzir a contaminação é utilizado dUTP e N-uracil-glicosilase.²³

1.5.3. Aerossois

Fennelly e colaboradores abriram caminho nas pesquisas com protótipos para recuperação de *M. tuberculosis* em aerossóis gerados pela tosse em indivíduos com tuberculose pulmonar, após semeadura e crescimento em cultura³⁴. Nesse estudo, os pacientes tossiam em uma câmara por cinco minutos em duas sessões. Dentre os pacientes estudados, 25% foram positivos em relação à baciloscopia, demonstrando que essa técnica é factível.³⁴

Guio e colaboradores estudaram material bacilar usando cartões de FTA e o analisaram por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)³⁵. Verificaram que há vantagens quanto à coleta, o transporte e o processamento das amostras de escarro. Esses autores verificaram ainda que os cartões FTA permanecem com material bacilar por 6 meses e podem ser analisados por PCR, que é uma técnica extremamente rápida (9 horas), além de apresentar maior sensibilidade, e especificidade igual à baciloscopia.³⁵

Wan e colaboradores demonstraram que um método de filtragem do ar proveniente de ambiente hospitalar, por no mínimo seis horas através de uma membrana, e posterior cultura da mesma, é eficaz para detectar *M. tuberculosis*.³⁶

Uma pesquisa prévia a esta, desenvolvida por Silva e colaboradores, analisou dois protótipos diferentes. O primeiro protótipo demonstrou ser factível para recuperação através de PCR de *M. tuberculosis* em aerossóis gerados pela tosse espontânea de um paciente sabidamente bacilífero, capturados em disco FTA, em um período de coleta de oito horas. Porém, a recuperação não foi reprodutível no segundo protótipo, na segunda etapa, em pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar e que realizaram três manobras forçadas de tosse consecutivas.³⁷

As dificuldades encontradas na prática clínica no manejo de pacientes infectados pelo *Mycobacterium*, partindo do pressuposto que muitos pacientes não apresentam expectoração espontânea, sendo submetidos por vezes à indução de escarro ou lavado broncoalveolar, somando-se à necessidade de novos métodos que encurtem o tempo de diagnóstico da doença, proporcionando agilidade na instalação do tratamento em pacientes infectados, e a retirada da

medicação e de seus consequentes efeitos adversos em pacientes com falsa suspeita de tuberculose; a confirmação da possibilidade de recuperação do *Mycobacterium tuberculosis* do aerossol proveniente da tosse de pacientes infectados, a efetividade do cartão FTA e da PCR utilizados com este intento; a escassez de estudos com a finalidade de buscar novas abordagens para o diagnóstico de uma doença que proporciona 3 milhões de óbitos anualmente no mundo, nos levam a uma conclusão quase óbvia. Fica nítida e urgente a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens e técnicas no diagnóstico da doença, onde a utilização de amostras no formato de aerossóis e protótipos de coletas de prática aplicação desponta como uma nova proposta no diagnóstico da tuberculose.³⁷

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo geral:

Desenvolver um protótipo de coleta, e avaliar o rendimento da recuperação por PCR do *M. tuberculosis* no material aerossolizado pela tosse, tomando-se como padrão áureo os resultados obtidos na cultura de escarro.

2.2. Objetivos específicos:

Desenvolver um protótipo para coleta de aerossóis gerados pela tosse.

Comparar alvos genéticos do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* quanto a sua sensibilidade e especificidade na análise das amostras coletadas no estudo.

Descrever o resultado da recuperação do bacilo através de baciloscopia de escarro, cultura e análise do material obtido através do protótipo de coleta.

Descrever as características epidemiológicas dos participantes.

3. METODOLOGIA:

3.1 Aspectos éticos

O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-UNISUL) da Universidade do Sul de Santa Catarina, em 20 de março de 2007, sob número 07.004.4.01.III.(Anexo 1)

3.2 Amostragem e critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar, acima de 18 anos, internados no Hospital Nereu Ramos (HNR – Florianópolis, Santa Catarina), no período de abril de 2010 a novembro de 2011, que concordaram em participar do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice A). Foram excluídos aqueles em tratamento com tuberculostáticos por um período maior que 15 dias, ou que estivessem há menos de três meses do término de tratamento anterior contra tuberculose.

Para cada paciente, aplicou-se o protótipo de pesquisa e coletou-se uma amostra de escarro. Em seguida, o protótipo e a amostra de escarro foram encaminhados ao LACEN/SC e ao Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias (LBMM), para a realização dos testes laboratoriais. Também foi proposto e realizado um questionário ao paciente, de conteúdo social, demográfico e epidemiológico. Foram coletadas informações referentes ao gênero, idade, raça, escolaridade, município de residência, ocupação, coinfeção pelo HIV, radiografia de tórax e tratamento instituído. (Questionário – Apêndice B).

3.2.1 Amostras de escarro

As amostras de escarro foram coletadas, preferencialmente, pela manhã, em jejum e após lavagem vigorosa da boca com água. Em seguida, foram encaminhadas ao LBMM e ao LACEN/SC. No LACEN/SC, foi realizada a baciloscopia. No LBMM, foram realizados os seguintes procedimentos: cultivo em meio sólido Ogawa-Kudoh, extração de DNA diretamente da amostra clínica, PCR do gene 16S rRNA e PCR da sequência de inserção

IS6110 (Figura 1). Todos os procedimentos foram realizados diretamente da amostra de escarro.

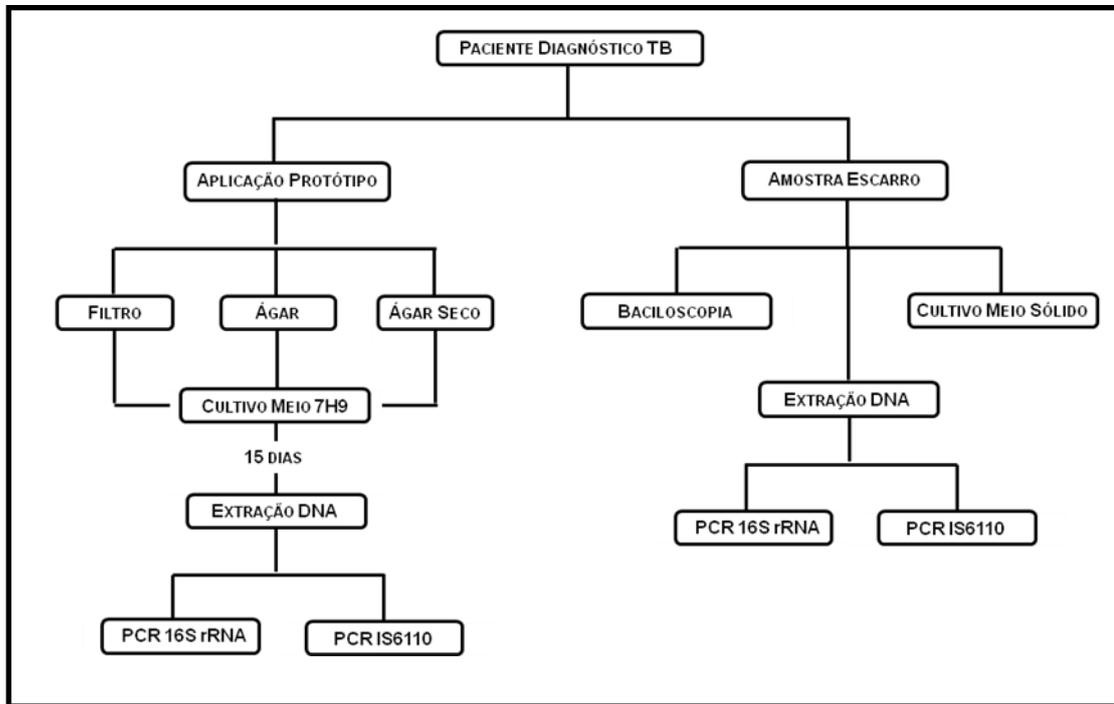


Figura 1: Fluxograma descrevendo os procedimentos realizados com as amostras.

3.2.2 Protótipo

3.2.2.1 Produção

O protótipo foi desenvolvido com a utilização de uma máscara de nebulização modelo Nevoni (figura 2), do fabricante NS. Foi fixado, na parte central de cada máscara, um pequeno filtro de gaze (figura 3). As máscaras com os filtros foram embaladas e esterilizadas com óxido de etileno. Em condições de esterilidade (fluxo laminar), as máscaras estéreis foram abertas tendo sido adicionados cerca de 500 µL de caldo Middlebrook 7H9 no filtro de gaze e cerca de 20 ml de ágar Middlebrook 7H10 (figura 4). Após a solidificação do ágar, as máscaras foram recolocadas nas embalagens, que foram lacradas para evitar contaminação dos meios (figura 5). As máscaras com os meios de cultura foram utilizadas no mesmo dia do preparo.

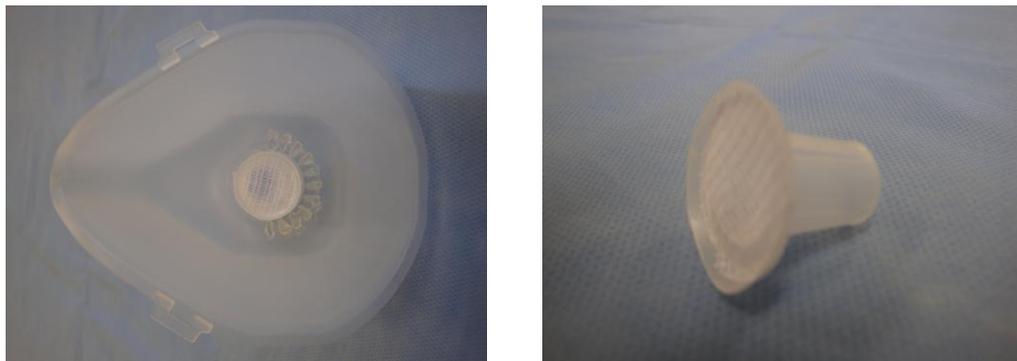


Figura 2 e 3: Máscara e filtro utilizados para desenvolvimento do protótipo.



Figura 4 e 5: Aplicação do Middlebrook 7H10 no fundo do protótipo(fig 3) e armazenamento estéril da mesma (fig 4).

3.2.2.2 Aplicação

Cada paciente recebeu um protótipo pré-fabricado em formato de máscara de nebulização, revestido internamente com meio de cultura para micobactérias e um filtro no seu interior. Durante o período de trinta minutos, foi continuamente incentivado a tossir dentro deste, sendo permitida a interrupção do processo em qualquer momento em que o paciente relatasse algum desconforto. Após a utilização de cada protótipo o mesmo foi armazenado em local estéril, lacrado contra possíveis contaminações e encaminhado ao LBMM.

O conteúdo das máscaras foi dividido em três partes: o filtro de gaze e duas partes de ágar. O filtro de gaze foi retirado e cultivado em caldo Middlebrook 7H9. Após 15 dias de cultivo, o meio foi transferido para um tubo cônico e centrifugado por 15 minutos a 1.000 X g. Do sedimento foi extraído o DNA. Do ágar, foram retirados diversos fragmentos que foram cultivados em caldo Middlebrook 7H9. Após 15 dias de cultivo, o meio foi transferido para um tubo cônico e centrifugado por 15 minutos a 1.000 X g. Do sedimento foi extraído o

DNA. O restante do ágar foi mantido nas máscaras, que foram mantidas na embalagem em estufa a 37°C por 15 dias ou até que o gel estivesse totalmente seco e quebradiço. Todo o conteúdo do gel seco de cada máscara foi cultivado em caldo Middlebrook 7H9. Após 15 dias de cultivo, o meio foi transferido para um tubo cônico e centrifugado por 15 minutos a 1.000 X g. Do sedimento foi extraído o DNA.

O DNA extraído foi submetido à PCR. Foram amplificados o gene 16S rRNA e a sequência de inserção IS6110 (Figura 1).

3.3 Baciloscopia

A baciloscopia foi realizada pelo LACEN/SC, segundo recomendações descritas no Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e Outras Micobactérias. Foi utilizada a coloração de Ziehl-Neelsen e a presença de bacilos, pesquisada com objetiva de 100X, foi expressa em cruces, da seguinte maneira: 3+ representam a presença de mais de 10 bacilos por campo, em 20 campos lidos; 2+ correspondem a 1 a 10 bacilos por campo, em 50 campos; 1+ corresponde a um total de 10 a 99 bacilos em 100 campos. A presença de 1 a 9 bacilos em 100 campos foi relatada com o número de exato de bacilos encontrados; já a ausência de bacilos em 100 campos representa um resultado negativo.³⁹

3.4 Cultivo de micobactérias:

3.4.1 Cultivo em meio sólido Ogawa-Kudoh

As amostras de escarro foram cultivadas em meio sólido Ogawa-Kudoh. Utilizou-se kit comercial contendo o meio de cultura acompanhado de solução descontaminante de NaOH 1N (Laborclin®, Brasil) e o procedimento foi realizado de acordo com instruções do fabricante. Mergulhou-se o swab estéril na região mais purulenta da amostra de escarro e, em seguida, em um tubo contendo a solução descontaminante. Após aguardar 2 minutos, o mesmo swab foi utilizado para semeadura por estriamento no meio de Ogawa-Kudoh, em duplicata. Os meios foram acondicionados em estufa 37°C e observados semanalmente para observação de crescimento bacilar até a oitava semana de incubação.³⁹

3.4.2 Cultivo em caldo Middlebrook 7H9:

Os fragmentos de ágar e o filtro do protótipo foram cultivados em meio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC (ácido oléico, albumina bovina, dextrose e catalase) (Himedia®, Índia). Os meios foram acondicionados em estufa 37°C por um período de 15 dias.

3.5 Extração de DNA:

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o método da guanidina 5M não baseado em fenol, diretamente das amostras de escarro e a partir do cultivo do protótipo (ágar e filtro) em meio líquido 7H9.⁴⁰

Para as amostras de escarro, foi realizado um processo de fluidificação e lise física precedente à extração do DNA. Para tanto, adicionou-se cerca de 400 µL de escarro, retirados da região mais purulenta da amostra, a um tubo de vidro contendo pérolas de vidro de 1 e 2 mm de diâmetro. Em seguida, adicionou-se 200 µL de solução de N-acetil-L-cisteína (NALC) 10% e agitou-se em vortex por 2 minutos. Após, adicionou-se 400 µL de solução de NaOH:SDS (NaOH 0,2N: SDS 1%) e agitou-se em vortex por 3 minutos. Adicionou-se, então, 200 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e agitou-se em vortex por 1 minuto^{41,42}. Entre cada agitação, aguardou-se 15 minutos para a continuação dos procedimentos, a fim de evitar a expansão dos aerossóis formados. Após a adição do acetato de sódio, as pérolas de vidro foram retiradas e lavadas com solução de GTE (Glicose 50mM: EDTA pH 8,0 10mM: Tris-Cl pH 8,0 25mM). As amostras foram centrifugadas a 1.000 x g durante 15 minutos e após adicionou-se 200 µL do sedimento a um tubo contendo 1 mL de solução de guanidina 5M (isotiocianato de guanidina 5M: Tris-Cl pH 6,4 0,1M: EDTA pH 8,0 0,2M: Triton X-100 13%), para a extração de DNA.^{41,42}

Os tubos contendo solução de guanidina 5M e amostra (de escarro ou de caldo Middlebrook 7H9) foram submetidos à agitação contínua overnight em mesa agitadora orbital, em temperatura ambiente (20 a 25°C), para lise das membranas celulares. Após a lise, foram adicionados 50 µL de solução de dióxido de sílica acidificada. A mistura foi homogeneizada por inversão durante 5 minutos e, após, submetida à centrifugação a 1.600 x g/1 minuto. O sedimento foi lavado 2 vezes com 500 µL de solução de lavagem de guanidina 5M (isotiocianato de guanidina 5M: Tris pH 6,4 0,1M), 2 vezes com 500 µL de etanol 70% (p/p) e 1 vez com 500 µL de acetona P.A. Entre cada lavagem, foi realizada centrifugação a

1.600 x g/1 minuto. O sedimento foi submetido à secagem a 56°C/10 minutos em termobloco e re-hidratado com 35 µL de tampão Tris-EDTA pH 7,4 (Tris pH 6,4 0,1M: EDTA pH 8,0 0,2M) a 56°C/10 minutos. Após centrifugação de 10.000 x g/5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um microtubo livre de RNase e DNase.^{41,42}

3.6 PCR

O DNA extraído diretamente das amostras de escarro e a partir do cultivo do protótipo em caldo Middlebrook 7H9 foram submetidos à PCR. Foram amplificados o gene 16S rRNA e a sequência de inserção IS6110.

3.6.1 Gene 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores F-285 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')³⁸ e Myc-264 (3'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-5'), que amplificam um fragmento de 1027 pb. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemanha) sob as seguintes condições: 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo adicional de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 10 minutos. Em todas as reações foram utilizados controles positivo (DNA extraído da cepa H37Rv) e negativo (ausência de DNA).²²

3.6.2 Sequência de inserção IS6110

Para a amplificação da sequência de inserção IS6110, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores INS1 (5'CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC 3') e INS2 (5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA 3'), que amplificam um fragmento de 244 pb. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemanha) sob as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 96°C por 3 minutos, 38 ciclos de 96°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 8 minutos. Em todas as reações foram utilizados controles positivo (DNA extraído da cepa H37Rv) e negativo (ausência de DNA).⁴⁴

3.6.3 Detecção dos fragmentos amplificados pela PCR

Os produtos da reação de amplificação do gene 16S rRNA e da sequência IS6110 foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 e 2%, respectivamente. Os géis foram corados pelo brometo de etídio (1 µg/ml), visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV- 20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT[®], Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com marcadores de tamanho molecular (50 pb e 100 pb).

3.7 Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram cadastrados em um banco de dados e analisados através do software SPSS[®]. As variáveis de interesse foram sumarizadas como percentagem ou média conforme indicado. O rendimento diagnóstico das técnicas utilizadas foi mensurado através da análise de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia.

4. RESULTADOS

Foram avaliados consecutivamente 27 indivíduos, sendo 18 (66,7%) masculinos e 22 (81,5%) caucasianos. A média de idade foi de 41 anos ($DP\pm 13,2$), com idade mínima de 23 e máxima de 76 anos. A maioria dos participantes possuía ensino fundamental incompleto (51,9%) e era procedente da Grande Florianópolis (70,4%).

Quanto ao tempo de tratamento na coleta de dados, 16 indivíduos (59,3%) estavam em tratamento há menos de sete dias. A média de tempo de tratamento foi de 6 dias ($DP\pm 4,7$), com tempo mínimo de um dia e máximo de 15 dias.

A dose combinada 4x1 estava sendo utilizada em 23 pacientes (85,2%), e o esquema de tratamento para TB-MDR em 4 (14,8%).

A AIDS estava associada em 11 participantes (40,7%).

Os resultados da baciloscopia de escarro mostraram-se negativos em um indivíduo (3,7%), 3+ em 13 (48,1%), 2+ em 9 (33,3%), e 1+ em 4 (14,8%). A radiografia de tórax evidenciou cavidades em 13 indivíduos (48,1%).

A cultura de escarro foi positiva em 24 casos (88,9%). A PCR de escarro com o alvo molecular 16SrNA foi positiva em 23 casos (85,2%), e com o alvo IS6110 em 27 casos (100%).

A PCR realizada no ágar foi positiva em 5 casos (18,5%) com o alvo 16SrNA, e em 10 casos (37%) com o alvo IS6110. No ágar seco, a PCR com o alvo 16SrNA foi positiva em 4 casos (14,8%), e com o alvo IS6110 foi positiva em 7 casos (25,9%).

A PCR realizada no material do filtro da máscara apresentou resultados positivos em 8 casos (29,6%) com o alvo 16SrNA e IS6110 respectivamente.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a quantidade de bacilos na baciloscopia de escarro e o resultado da cultura ($p=0,071$).

A Tabela 1 demonstra o rendimento das técnicas diagnósticas tomando-se como padrão áureo a cultura de escarro.

Tabela 1 – Rendimento das técnicas tomando-se como padrão áureo a cultura de escarro.

| Técnica | Acurácia (IC 95%) | Sensibilidade (IC 95%) | Especificidade (IC 95%) | Valor Preditivo Positivo (IC 95%) | Valor Preditivo Negativo (IC 95%) |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--|--|
| PCR Escarro 16SrNA | 0,89 (0,77- 1,0) | 0,91 (0,8-1,0) | 0,68 (0,1-1,2) | 0,96 (0,9-1,0) | 0,5 (0,0-0,7) |
| PCR Escarro IS6110 | 0,89 (0,77- 1,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0 (0,0-0,0) | 0,89 (0,77- 1,0) | - |
| PCR Ágar 16SrNA | 0,3 (0,12- 0,47) | 0,21 (0,04- 0,37) | 1,0 (1,0-1,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,14 (0,0- 0,43) |
| PCR Ágar IS6110 | 0,48 (0,29- 0,67) | 0,4 (0,2-0,6) | 1,0 (1,0-1,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,18 (0,0- 0,41) |
| PCR Ágar Seco 16SrNA | 0,26 (0,09- 0,42) | 0,17 (0,02- 0,32) | 1,0 (1,0-1,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,13 (0,0- 0,46) |
| PCR Ágar Seco IS6110 | 0,37 (0,19- 0,55) | 0,29 (0,11- 0,47) | 1,0 (1,0-1,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,15 (0,0- 0,41) |
| PCR Filtro 16SrNA | 0,41 (0,22- 0,59) | 0,33 (0,14- 0,52) | 1,0 (1,0-1,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,16 (0,0- 0,41) |
| PCR Filtro IS6110 | 0,41 (0,22- 0,59) | 0,33 (0,14- 0,52) | 1,0 (1,0-1,0) | 1,0 (1,0-1,0) | 0,16 (0,0- 0,41) |

Não houve associação estatisticamente significativa entre o resultado quantitativo da baciloscopia com o tempo de tratamento para tuberculose, tomando-se como ponto de corte 7 dias ($p=0,510$).

A Tabela 2 demonstra o resultado da baciloscopia de acordo com o padrão radiográfico.

Tabela 2 – Resultado da baciloscopia de acordo com o padrão radiográfico.

| Baciloscopia | Padrão Radiográfico | |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Com Cavidade n(%) | Sem Cavidade n(%) |
| 1+ | - | 4 (28,6) |
| 2+ | 4 (30,8) | 5 (35,7) |
| 3+ | 9 (69,2) | 4 (28,6) |
| Negativa | - | 1 (7,1) |
| Total | 13 (100) | 14 |

p = 0,030

Não houve associação estatisticamente significativa entre o resultado da cultura e o tempo de tratamento (p=0,643), bem como com o padrão radiográfico (p=0,124).

5. DISCUSSÃO:

O protótipo desenvolvido neste trabalho tornou viável a recuperação do *Mycobacterium*, em amostras de aerossóis, de pacientes internados com diagnóstico de tuberculose.

A tuberculose, junto ao HIV e à malária foram declaradas inimigas globais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo a primeira considerada como estado de emergência global a partir de 1993. Nesse contexto, foram criadas medidas de controle da doença, onde o objetivo guia era da viabilização de medidas de contenção dos casos dentro das próprias comunidades de onde estes surgiam⁴⁷. Para isso o diagnóstico precoce constituía em peça chave no programa, uma vez que o atraso no diagnóstico traz não só um prejuízo direto ao prognóstico do paciente acometido, como também acentua a taxa de transmissão e perpetuação da endemia na comunidade. Os principais testes diagnósticos atualmente utilizados; bacterioscopia e cultura de escarro; são dependentes da colaboração do paciente e da capacidade do mesmo em produzir expectoração de viabilidade analítica laboratorial. Logo, a criação de novos métodos diagnósticos que simplifiquem e aperfeiçoem a detecção do *Mycobacterium* nos pacientes acometidos pela doença, é de vital importância no controle deste patógeno, cujo legado o coloca como o organismo que mais causou a morte na história da humanidade, e que continua representando uma das principais causas de óbito em pleno século XXI.⁴⁷

Os resultados do presente estudo provam que é possível a recuperação do *Mycobacterium*, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em aerossóis gerados pela tosse e captados por um protótipo no formato de máscara, desenvolvido pelos autores, em pacientes com forte suspeita diagnóstica de tuberculose. Baseado nesses resultados será discutido a viabilidade da recuperação do bacilo em aerossóis. A discussão deste tema apresenta-se, todavia, como assunto de grande relevância na comunidade científica atual, até mesmo porque a compreensão da aerobiologia que envolve a transmissão do agente da tuberculose através de gotículas que o carregam ainda é muito limitada, permanecendo ainda como um desafio a captura daqueles aerossóis que são naturalmente eliminados pelo paciente em sua fase bacilífera.⁴⁸

Neste trabalho foram aplicados protótipos diagnósticos em uma amostra de pacientes internados em hospital de referência para tratamento de tuberculose pulmonar.

Florianópolis foi a cidade com maior número de novos casos em 2010, sendo o HNR o responsável pela internação de 16% destes casos, segundo dados da Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina (DIVE-SC). A amostra analisada contendo 27 indivíduos, com predomínio de adultos masculinos, entre a terceira e quinta década de vida, e ensino fundamental incompleto, segue o padrão epidemiológico brasileiro e catarinense descrito na literatura^{39,45}. O predomínio de pacientes adultos jovens, com baixa escolaridade e baixa condição socioeconômica, só vem a enfatizar o padrão estereotipado de incidência da tuberculose em nosso território. Por outro lado, uma vez que nenhum outro critério de seleção, além da internação para tratamento de tuberculose, foi utilizado na formação da amostra, podemos confortavelmente sugerir, a princípio, a inexistência de vieses tendenciosos na escolha dos pacientes, que poderiam influenciar na distribuição de gênero, faixa etária ou nível social da amostragem. Desta forma, é seguro afirmar que, mesmo com um número pequeno de participantes do estudo, obtivemos sucesso em reunir um grupo condizente, em grande parte, com o perfil do paciente com tuberculose encontrado na população brasileira e catarinense.

A dose combinada de drogas tuberculostáticas estava sendo utilizada em 85,2% dos pacientes analisados, enquanto somente na pequena parcela restante foi utilizado o tratamento preconizado para TB-MDR. O fato de terem sido analisadas amostras de bacilos apresentando diferentes espectros de resistência nada influenciou na técnica de PCR utilizada para recuperação do *Mycobacterium* nos protótipos desenvolvidos. A técnica de PCR se utiliza de alvos genéticos não envolvidos diretamente nos padrões de resistência do patógeno, e sim inserções como o IS6110 e o 16SrRNA imensamente mais comuns nas diferentes cepas do agente da tuberculose, independentemente de seu padrão de resistência aos medicamentos utilizados no controle da doença.

Foi estabelecido, a princípio, como um dos critérios de seleção dos pacientes incluídos no estudo, um tempo máximo de tratamento, independente do esquema utilizado na terapêutica, de quinze dias. A ausência de tratamento prévio por no mínimo três meses antes do acometimento pela doença também foi critério selecionador do conteúdo da amostragem. Houve na amostra, um predomínio de pacientes com tempo de tratamento menor que sete dias.

Considerando que o paciente bacilífero deixa de transmitir o *Mycobacterium* após um período de tratamento de quinze dias e que há rápido decréscimo de positividade das culturas geradas por aerossóis gerados pela tosse após a vigência de tratamento efetivo por 21 dias, tal como especificado na literatura^{34,10}, o critério de seleção por dias de tratamento justifica-se. Ainda cabe inferir que o tempo de tratamento de cada paciente selecionado para o estudo, não tenha influenciado significativamente nos resultados obtidos posteriormente, uma vez que, em um paciente não-bacilífero, não haveria razão em aplicar um protótipo diagnóstico que busca coletar bacilos expelidos em aerossóis. Desta maneira podemos concluir que o ponto de exclusão por dias de tratamento foi adequadamente estabelecido.

O critério de exclusão escolhido por tempo livre de tratamento pré-diagnóstico, que selecionou apenas os indivíduos que tivessem um tempo superior a três meses livres de tratamento com drogas tuberculostáticas, parte da premissa de que, com este método, sejam selecionados apenas os pacientes que apresentem caso novo da doença. Com isso, ficam excluídos doentes que tenham feito tratamento, porém não tenham alcançado cura da doença, ou por má adesão ao tratamento, ou por resistência do bacilo às drogas empregadas.

Atualmente cerca de 11 milhões de pessoas no mundo estão co-infectados pelo *Micobacterium tuberculosis* e o vírus HIV. No Brasil, cerca de 8% dos pacientes com tuberculose também tem AIDS. Em Santa Catarina, dados da DIVE-SC relatam que a prevalência de coinfeção TB/HIV é de 21%⁴⁹. Do total da amostra coletada para o estudo, 40,7% dos pacientes estavam co-infectados com TB/HIV, sendo destes, todos acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Esta diferença de prevalência entre os números encontrados na população do estado e na amostra coletada são facilmente compreendidos, ao levarmos em consideração os seguintes fatos: os pacientes selecionados foram obtidos em um serviço de internação do HNR, referência em molestias infecciosas no estado; o acometimento de pacientes com AIDS pela tuberculose, geralmente provoca um quadro mais grave que no imunocompetente, levando a maiores taxas de internação dos primeiros; e a coinfeção HIV/TB muitas vezes se encontra imposta em um contexto de vulnerabilidade social que motiva as internações como garantia de tratamento efetivo.

Outro fator a ser avaliado da prevalência encontrada entre HIV/TB no presente estudo é o grau de influência que esse grande número de pacientes com AIDS proporcionou na avaliação do protótipo em análise. Encontramos na literatura referências que mostram uma menor sensibilidade da bacterioscopia em pacientes com AIDS avançada⁵⁰. Nesses indivíduos, o comprometimento da imunidade celular está associado a uma baixa reação

inflamatória pulmonar local, e uma maior taxa de proliferação do *mycobacterium* no parênquima, o que é expresso como uma baixa produção de escarro e, conseqüentemente, uma diminuição dos índices de expectoração⁵¹. Logo, é de esperar que a baciloscopia de escarro nesses pacientes, tenha um rendimento menor, quando comparado à baciloscopia em pacientes imunocompetentes. Da mesma forma, podemos supor que a análise de amostras de pacientes que vivem com HIV/SIDA, provenientes de aerossóis expectorados na máscara, durante trinta minutos, poderia influenciar negativamente nos resultados totais, proporcionando um aumento no número de falsos negativos, e diminuindo a sensibilidade da técnica. A alternativa de não utilizar pacientes coinfectados com HIV/TB, entretanto, não era viável, já que tal critério de seleção promoveria uma diminuição significativa no universo amostral, reduzindo a significância estatística dos resultados.

Os resultados da baciloscopia de escarro mostraram-se negativos em um indivíduo (3,7%), 3+ em 13 (48,1%), 2+ em 9 (33,3%), e 1+ em 4 (14,8%). Considerando que um dos critérios de seleção de pacientes para o estudo era constituído pela forte suspeita clínica e laboratorial de acometimento pela tuberculose, os resultados condizem com o esperado.

A radiografia de tórax evidenciou a presença de cavidades em 13 indivíduos (48,1%). Porcentagem muito próxima ao de pacientes enfermos sem coinfeção com o vírus HIV. Tal dado somente comprova o que já está amplamente descrito na literatura. Pacientes com AIDS em fase avançada e contagem de linfócitos abaixo de 200 células/mm³, raramente apresentam presença de cavidade nas radiografias de tórax, em virtude de seu comprometimento imunológico celular. A falta de uma reação imunológica celular adequada impede o aparecimento do granuloma, e da cavitação pulmonar.⁴⁶

Analisando e comparando os resultados da PCR com os resultados da cultura de escarro, foi encontrada uma maior sensibilidade na PCR. A PCR de escarro mostrou-se positiva em 100% dos casos, quando utilizado o alvo IS6110, e em 85,2% dos quando utilizado o alvo 16SrRNA, enquanto que a cultura em meio de LJ foi positiva em 88,9% dos casos. A cultura de escarro possui sensibilidade publicada na literatura de aproximadamente 92%⁵², enquanto a PCR, em amostras com baciloscopia positiva, apresenta sensibilidade de 95% e especificidade de 98%⁵³. Apesar disso, segundo a III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, não é recomendada a substituição da cultura pela técnica de PCR, sugerindo que sua utilização seja limitada a casos de urgência diagnóstica e somente seja realizada em serviços laboratoriais de referência⁵⁴. Além disso, a limitação da PCR, evidente nessa análise, se encontra nas amostras com baciloscopia negativa, que sabidamente é um fator que diminui grandemente o rendimento da técnica.⁵³

O *Mycobacterium* foi recuperado em 62,9% das amostras coletadas com o protótipo diagnóstico desenvolvido em nosso estudo. O protótipo dependia da recuperação de aerossóis exalados pela tosse dos pacientes analisados, pela técnica de PCR, utilizando-se dos alvos genéticos IS6110 e 16SrRNA. Logo, não só foi possível a recuperação do *mycobacterium* de aerossóis exalados pela tosse de pacientes, como também foi alcançada uma taxa de recuperação satisfatória. Nossos resultados, entretanto, não condizem com parte da literatura, onde é descrita a não viabilidade da recuperação, via PCR-IS6110, do *mycobacterium* de ar exalado de pacientes com baciloscopia e forte suspeita diagnóstica de tuberculose ⁵⁵. A diferença encontrada em nossos resultados leva a questionamentos quanto às diferenças nas técnicas utilizadas em cada estudo. Enquanto no trabalho de Jain e colaboradores ⁵⁵, os pacientes eram submetidos a coleta de ar exalado e posteriormente condensado, não sendo incentivados a expectorar ou realizar esforço de tosse, em nosso estudo, os pacientes eram frequentemente incentivados a realizar manobras de tosse forçadas. Além disso, no estudo presente foi utilizado um protótipo de coleta no formato de máscara, embebido em meio de cultura, favorecendo que o material exalado e expectorado obtivesse maior captação em uma grande superfície aderente.

Outro estudo, por outro lado, obteve sucesso na recuperação por PCR de amostras coletadas em filtros tanto de quartos de internação com pressão negativa como de aparelhos de ventilação respiratória de pacientes entubados, em pacientes com forte suspeita diagnóstica de tuberculose, fracassando, porém, no cultivo desses elementos ⁵⁶. A praticidade e o preço do protótipo desenvolvido neste projeto, por outro lado, é imensamente mais vantajoso e mais eficiente, quando comparado ao desenvolvido por Wan e colaboradores. ⁵⁶

Em 55,5%, o bacilo foi recuperado utilizando o alvo IS6110, e em 40,7% das amostras utilizando o alvo 16SrDNA. O maior rendimento da PCR, na recuperação do bacilo, quando utilizado a sequência de repetição molecular IS6110 é respaldado pela literatura, onde é descrito o aumento do rendimento da PCR quando escolhidos alvos genéticos de inserção repetida, ao invés de inserções únicas. Nesse contexto, o IS6110 é a sequência mais utilizada na amplificação do bacilo da tuberculose, apresentando sensibilidade de até 72% e especificidade de 95%, em escarros induzidos. ²⁷

Na tentativa de recuperação do *Mycobacterium* através do protótipo, foram analisadas laboratorialmente diferentes partes e materiais constituintes da máscara após a coleta de cada paciente. Dentre estes, o material que apresentou os melhores resultados foi o ágar raspado do fundo da máscara. O mesmo foi retirado logo após a coleta, sendo depositado em meio líquido próprio para cultivo do bacilo, e analisado por PCR. Com isso, através da utilização do alvo

IS6110, obteve-se acurácia de 48%, sensibilidade de 40% e valor preditivo negativo de 18%. O entendimento da supremacia deste método sobre os demais pode ser interpretado. O ágar foi o meio de cultura utilizado para recobrir o fundo da máscara, com o objetivo de aumentar a efetividade de aderência do bacilo à parede do protótipo melhorando a recuperação do patógeno em análise posterior. Com isso, este material foi o que teve maior superfície de contato com o material exalado de cada paciente que foi testado. Essa maior superfície provavelmente propiciou reunião de um maior conjunto de bacilos, e conseqüentemente melhores resultados na PCR do material.

Ainda nesse contexto, o segundo maior rendimento na recuperação do bacilo foi alcançado na PCR do material proveniente do filtro utilizado no protótipo de coleta. A partir desse material, foi possível recuperar o bacilo em 16 amostras distintas, com uma acurácia de 41%, sensibilidade de 33% e valor preditivo negativo de 16%, através de PCR. Em 50% das análises positivas, a PCR foi realizada através da busca do alvo IS6110 e na outra metade com o alvo 16SrRNA. Os índices positivos neste material também podem ser justificados. O filtro ficou posicionado no orifício de saída do ar e do material exalado pelo paciente, sendo, portanto, atingido por quase a totalidade do fluxo que entrava na máscara. Logo, um dos locais de maior probabilidade de fixação do material contendo o bacilo deveria ser exatamente o filtro embebido em caldo de cultura. Não por acaso, nos outros poucos estudos realizados com a tentativa de recuperar o *Mycobacterium* por aerossóis realizados com sucesso (WAN et al.,2004), o material analisado era exatamente o filtro dos protótipos naquele momento desenvolvidos e utilizados. Logo, através do estabelecimento de uma via de saída semipermeável para o fluxo exalado pelo paciente durante sua respiração, impomos uma superfície e um fluxo contínuo para que o patógeno se fixe, e seja posteriormente recuperado.

O ágar seco, por último, apresentou os piores rendimentos, com uma acurácia de 37%, sensibilidade de 29% e valor preditivo negativo de 16%, quando analisados com o alvo IS6110. Esses resultados inferiores aos demais já citados deve se originar a partir de uma explicação mecânica do método utilizado para a análise desse material. O ágar a fresco, do fundo do protótipo, quando em laboratório, logo após a coleta, teve sua superfície raspada e analisada. O restante do ágar que permanecia na máscara foi para uma estufa onde foi secado por 15 dias, e posteriormente analisado após esse período, recebendo a denominação de ágar seco. Logo, é lógico inferir, que o ágar a fresco raspado inicialmente do protótipo acabou por levar consigo grande parte dos bacilos contidos naquela superfície, proporcionando um maior rendimento para o ágar a fresco, e um menor rendimento para o Agar seco.

Todos esses dados indicam que a técnica de recuperação do bacilo por PCR do Agar a fresco é o caminho de escolha na obtenção de melhores rendimentos. Com isso, é impossível deixar de questionar se outras possibilidades e melhorias desta técnica não alterariam o rendimento promovendo um aumento da sensibilidade do mesmo. Uma alternativa viável seria aumentar a superfície de contato entre o ágar fresco e o material exalado pelo pacientes. Tal modificação, de fácil aplicação, poderia ser atingida na utilização de máscaras maiores, com maior superfície de fundo.

Além disso, em abordagens futuras, a análise do ágar a seco poderia ser realizada de material que não fosse submetido à raspagem prévia, sendo analisada integralmente, na tentativa de incrementar o rendimento dessa opção. Caso os resultados dessa nova abordagem não gerassem melhores resultados seria desnecessário aguardar 15 dias para analisar os diferentes materiais das amostras coletadas. Tal como demonstrado pelos resultados deste estudo, os melhores resultados foram encontrados no material submetido à análise em momentos próximos ao da coleta, uma vez que tanto o ágar a fresco como o filtro foram analisados em momentos muito próximos ao da chegada do material ao laboratório.

A distância necessária entre protótipo e paciente não foi avaliada neste estudo. Logo caberá a estudos futuros a investigação desta variável, de maneira a esclarecer qual a distância mínima necessária na qual é possível recuperar o bacilo exalado por meio de aerossóis. A quantificação desta nova variável, inclusive, será de extrema utilidade no preenchimento de lacunas no conhecimento do que concerne à fisiopatogenia da transmissão nosocomial do *Mycobacterium tuberculosis*.

Além disso, mesmo o protótipo desenvolvido em si ainda possui recursos potenciais que não foram totalmente explorados e utilizados neste estudo. A distribuição homogênea e uniforme de meio de cultura próprio ao crescimento do *Micobacterium* por toda a superfície das máscaras, e não somente no fundo da mesma, por exemplo, pode ser um fator que incremente o rendimento da técnica além daqueles encontrados neste trabalho. Outras alterações no protótipo original devem ser criadas e testadas, de maneira a acompanhar as novas informações que surgirem a respeito da transmissão nasocomial do patógeno da tuberculose.

6. CONCLUSÕES:

A recuperação do *Mycobacterium tuberculosis* de amostras de aerossóis de pacientes com suspeita de tuberculose analisados por PCR é viável.

Neste trabalho foi desenvolvido um protótipo de coleta de aerossóis para recuperação do *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes em tratamento para tuberculose. O protótipo tem o formato de uma máscara de nebulização convencional, revestido internamente com meio de cultura próprio para o cultivo do bacilo, e acrescido de um filtro semipermeável em seu orifício de saída do fluxo aéreo exalado.

Através da utilização do protótipo e sua análise por PCR obtivemos sucesso na recuperação de 62,9% das diferentes amostras analisadas no estudo.

O maior rendimento encontrado para a recuperação do *Mycobacterium* no material aerolissolizado pela tosse foi encontrado através da análise do ágar fresco retirado da superfície do fundo do protótipo desenvolvido neste estudo. Este material foi posteriormente submetido a análise por PCR, com a utilização do alvo genético IS6110, e seus resultados interpretados, fornecendo acurácia de 48%, sensibilidade de 40% e valor preditivo negativo de 18%.

Na comparação dos dois alvos genéticos do *mycobacterium*, IS6110 e 16SrRNA, utilizados na análise laboratorial dos diferentes materiais integrantes do protótipo desenvolvido (ágar e filtro), foi encontrada grande superioridade na técnica utilizando o alvo IS6110, em termos de sensibilidade. A especificidade encontrada foi a mesma para ambos os alvos pesquisados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Veronesi R. Tratado de Infectologia. 2010. Quarta Edição. Atheneu.
2. Daniel T. The history of tuberculosis. Elsevier. Respiratory Medicine. 2006 Ago 9; 100, 1862–1870.
3. Rosemberg J. Tuberculose-Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. Boletim de Pneumologia Sanitária. 1999 Vol. 7, Nº 2.
4. Brasil. Controle da Tuberculose: Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
5. Smith I. Mycobacterium tuberculosis. Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. 2003 Jul. Vol 16; Nº 3; p. 463–496.
6. Dorronsoro II, Torroba L. 2007 . An. Sist. Sanit. Navar. 2007 Vol. 30, Suplemento 2.
7. Hijjar M, Oliveira R, Teixeira G, Procopio M. A tuberculose no Brasil e no mundo. 2001. Boletim de Pneumologia Sanitária - Vol. 9, Nº 2 - jul/dez – 2001.
8. Grimes N, Freitas S. Aspectos epidemiológicos da situação de encerramento dos casos de tuberculose pulmonar bacilífera do Estado de Santa Catarina, Brasil. 2007.
9. Braunwald, Eugene; Fauci, Anthony S.; Longo, Dan L.; Jameson, J. Larry; Hauser, Stephen L.; Kasper, Dennis L. Harrison's Principles of Internal Medicine. 2005. 16ª Edição. McGraw-Hill, 2005.
10. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. 2010
11. Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. 2007. Journal Bras Pneumolo. Jun;33(3):323-34.
12. Ahmad S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. 2010. Clinical & Developmental Immunology. Volume 2011, Article ID 814943
13. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Tuberculose. Padronização de Condutas. 2009. 3ª edição.
14. Comissão de Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III Diretrizes para Tuberculose da SBPT. 2009. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2009; 35(10):1018-1048.
15. Campos H. Diagnóstico da Tuberculose. 2006. Pulmão RJ 2006;15(2):92-99.
16. Lima A; Martins S; Souza J; Salem J. Meios de Cultivos Aplicados ao Diagnóstico Laboratorial da Tuberculose. 2010. News Lab. Edição 103. 2010.
17. Rattan A. 2000. PCR for Diagnostic of Tuberculosis: Where are we now ? Ind. J Tub. 2000, 47. 79.
18. Kubista M; Andrade J; Bengtsson M; Forootan A; Jonák J; Lind K; Sindelka R; Sjöback; Sjögreen B; Strömbom L; Stahlberg A; Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. 2006. Molecular Aspects of Medicine 27 (2006) 95-125.
19. Burpo F. A critical review of PCR primer design algorithms and cross hybridization case study. 2011. Biochemistry 218; CA 94305.

20. Assis N; Lopes M; Cardoso N; Costa M; Souza C; Lima K. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. 2007. *Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial*, v. 43, n. 1, p. 1-7, fevereiro 2007.
21. Mello F. Avaliação da utilidade clínica da pesquisa do ADN do *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica de PCR em lavados broncoalveolares para o diagnóstico de tuberculose pulmonar paucibacilar. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1998. p 132.
22. Waléria-Aleixo A; Kroon EG; Campos M; Marquitti M, Bonjardim C; Ferreira P. Heteroduplex mobility assay for rapid, sensitive and specific detection of mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 200, Apr; 36(4); 225-35.
23. Yuen K, Chan C, Yam W, Ho P, Chau P. IS6110 based amplotyping assay and RFLP fingerprinting of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clinical Pathology*. 1995 October, 48(10):924-928.
24. Agasino C, Ponce de Leon A, Jasmer R, Small P. Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains in San Francisco that do not contain IS6110. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998 Jun; 2(6):518-520.
25. Moatter T, Mirza S, Siddiqui M, Soomro I. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin embedded intestinal tissue specimens by polymerase chain reaction: characterization of IS6110 element negative strains. *J Pak Med Assoc*. 1998 Jun. 48(6):174-8.
26. Chauhan D, Sharma V, Parashar D, Chauhan A, Singh D, Das R, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from different parts of India based on IS6110 element polymorphism using RFLP analysis. *Indian J Med Res* 125. April 2007, pp 577-578.
27. Santos L, Kipinis A, Kipinis A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de patologia tropical*. Vol 36(1):1-15.jan-abr. 2007.
28. Kox L, Rhienthong D, Miranda A, Udomasantisuk N, Ellis K, Leeuwen J, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1994 March,32(3): 672-678.
29. Rosseti M, Silva C, Rodrigues J. *Doenças Infecciosas -Diagnóstico Molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
30. Victor T, du Toit R, Helden P. Purification of sputum samples through sucrose improve s detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction.1992. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 1514-1517
31. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheimvan Dillen PM, Noordaa J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
32. Schere L; Kritiski A. Avaliação da técnica de PCR in house no diagnóstico de tuberculose pulmonar. 2007. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Ciências-Biológicas Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
33. Cafrune P; Zaha A; Rosseti M. Avaliação da técnica de sopoligotyping aplicada diretamente em amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose e caracterização epidemiológica. 2009. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas e Bioquímicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

34. Fennelly KP, Martyny JW, Fulton KE, Orme IM, Cave DM, Heifets LB. Cough-generated aerosols of *Mycobacterium tuberculosis*. A new method to study infectiousness. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:604-609.
35. Guio H, Okayama H, Ashino Y, Saitoh H, Xiao P, Miki M, Yoshihara N, Nakanowatari S, Hattori T. Method for efficient storage and transportation of sputum specimens for molecular testing of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10:906-910.
36. Wan GH, Lu SC, Tsai YH. Polymerase chain reaction used for the detection of airborne *Mycobacterium tuberculosis* in health care settings. *Am J Infect Control* 2004; 32:17-21.
37. Silva, RM; Mori, LK; Bazzo, ML; Chagas, M. Avaliação de um protótipo para coleta de *Mycobacterium tuberculosis* em aerossóis gerados pela tosse. *Pulmão RJ* 2008;17:2-6.
38. Böddinghaus B, Rogall T, Florhr T, Blocker H, Bottger E. Detection and identification of micobactéria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28,p. 1751-1758, 1990.
39. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1.ed. Brasília, 2008a. Disponível:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf>. Acesso em set/2011.
40. Gerstein A. *Molecular Biology – Problem solver: A Laboratory Guide*. New York: Wiley Liss, 2001.
41. Kubica G, Dye W, Cohn M, MiddlebrookG. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodiumhydroxide for culture of mycobacteria. *American Review of Respiratory Disease*, 1963, v.87, p. 775-779.
42. Nogueira C, Wildner L, Senna S , Rovaris D, Gruner M, Jakimiu A, Silva R, Bazzo M. Alternative sputum treatment to improve the PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. Article in press.
43. Rogail T, Flohr T, Bottger E. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *Journal of General Microbiology*, 1990, v. 136, p.1915-1920.
44. Embden A, Cave D, Crawford J, Dale J, Eisenach K, Gicque B,et al. M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, v.31, p. 406-409
45. Silva F, Oliveira S, Botelho L. Epidemiologia da tuberculose no estado de Santa Catarina. *ACM arquivo catarinense de medicina*. 19(2): 113-20, abri-jun. 1990.
46. Haramati L,Avital E. Approach to the diagnosis of pulmonary disease in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Jornal Thorac Imaging*,1998 Oct; 13(4):247.
47. Storla D, Ymer S, Bjune G. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *BMC Public Health*. 2008, 8:15.
48. Nardell E. Catching a droplet Nuclei Toward a Better Understanding of Tuberculosis Transmission. *AM J. Respir Crit. Care Med*. 2004, March. Vol 169no 5 553-554.

49. Juncks N, Mendonça S, Silva M, Coelho S, Hoffelder M. Programa Estadual de Controle da Tuberculose. Secretaria Estadual da Saúde. DIVE. 2010.
50. Zamarioli L, Coelho A, Pereira C, Ferrazoli L, Bammann R. Identificação laboratorial de micobactérias em amostras respiratórias de pacientes HIV-positivos com suspeita de tuberculose. Ver. Soc. Bras.Med.Trop. 2009, June. Vol 42,nº3.
51. Santos J, Beck S. A coinfeção tuberculose e HIV:um importante desafio. RBAC. 2009. vol.42(3):209-215.
52. Almeida E, Azevedo dos Santos M, Afiune J, Spada D, Melo F. Rendimento da cultura de escarro na comparação de um sistema de diagnóstico automatizado com o meio de Lowenstein-Jensen para o diagnóstico de tuberculose pulmonar. 2005. J Brás pneumol. Vol 31 n3.
53. Sarmiento O, Weigle K, Alexander J, Weber D, Miller W. Assessment by Meta-Analysis of PCR for Diagnosis of Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology. July 2003. Vol41 n°7 3233-3240.
54. Comissão de Tuberculose da SBPT. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. 2009. J Bras Pneumol. 35(10):1018-1048.
55. Jain R, Schriever C, Danzieger L, Cho S, Rubistein I. The IS6110 Repetitive DNA Element of Mycobacterium tuberculosis Is Not Detected in Exhaled Breath Condensate of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. 2007. Respiration. 74:329-333.
56. Wan G, Lu S, Tsai. Polymerase chain reaction used for detection of airborne Mycobacterium tuberculosis in health care settings. 2004. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology. Vol 32. N°1.

NORMAS ADOTADAS

Este trabalho foi realizado seguindo a normatização para trabalhos de conclusão do Curso de Graduação em Medicina, aprovada em reunião do Colegiado do Curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina, **em 16 de junho de 2011.**

APÊNDICE A**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa “Detecção de *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica de PCR em aerossóis gerados pela tosse: método comparativo com baciloscopia e cultura”, e que recebi, de forma clara e objetiva, todas as explicações pertinentes ao projeto e que todos os dados a meu respeito são sigilosos. Eu compreendo que neste estudo as coletas de escarro e de material proveniente da tosse serão feitas em mim.

Declaro que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

Nome: _____

RG: _____

Local e data: _____

Assinatura: _____

APÊNDICE B

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS

NOME: _____ PRONTUÁRIO: _____
 RAÇA: () CAUCASIANO () NÃO CAUCASIANO
 ESCOLARIDADE: _____ PROFISSÃO: _____
 MUNICÍPIO DE RESIDÊNCIA: _____
 IDADE: _____ GÊNERO: () MASCULINO () FEMININO

DADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS:

DATA DO DX TB: _____ () CASO NOVO () ABANDONO () RECIDIVA
 () TBMR
 DATA INÍCIO TTTO. ATUAL: _____
 DROGAS EM USO: () DOSE COMB. 4x1 () RHZ () RH () RHZE
 () ESQUEMA TBMR
 () ESQUEMA ESPECIAL: _____
 BACILOSCOPIA DE ESCARRO: _____ DATA: _____
 CULTURA DE ESCARRO: _____ DATA: _____
 HX CONTATO INTRADOMICILIAR TB: () SIM () NÃO SE SIM, HÁ QTO
 TEMPO: _____
 CO-INFECÇÃO TB – HIV : () SIM () NÃO
 RX DE TÓRAX: () COM CAVIDADE () SEM CAVIDADE

PERCEPÇÃO DA DOENÇA

VOCÊ SABE COMO SE PEGA ESTA DOENÇA? (): NÃO () SIM COMO?
 VOCÊ SABE COMO PEGOU ESTA DOENÇA? (): NÃO () SIM COMO?
 VOCÊ CONHECE AS MANEIRAS DE PREVENÇÃO DESSA DOENÇA?

VOCÊ CONSIDERA QUE PODERIA TER FEITO ALGUMA COISA PARA NÃO ESTAR DOENTE?

() NÃO () SIM O QUE?

| |
|-----------------------------|
| DADOS LABORATORIAIS: |
|-----------------------------|

APRESENTAÇÃO AMOSTRA: () PURULENTA/MUCO-PURULENTA () MUCÓIDE
() SALIVAR

TURNO COLETA: () MATUTINO () VESPERTINO DATA DO

PRODESSAMENTO:

ANEXO 1



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP UNISUL

Pedra Branca, 20 de março de 2007
Registro no CEP (código): 07.004.4.01.III

Ao pesquisador(a): Rosemeri Maurici da Silva
Curso de medicina TB

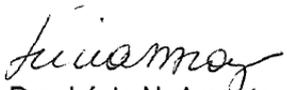
Prezado(a) Senhor(a):

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa "Detecção de Mycobacterium tuberculosis pela técnica de PCR em aerossóis gerados pela tosse: método comparativo com baciloscopia e cultura", foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNISUL. Esta CEP-UNISUL segue a legislação federal brasileira. Trata-se de colegiado criado para contribuir ao desenvolvimento da pesquisa na UNISUL dentro de elevados padrões éticos. Avalia, eticamente, projetos de pesquisas em seres humanos (não somente os da área de saúde), projetos de pesquisas em animais, projetos envolvendo biossegurança, pesquisas com cooperação estrangeira, pesquisas de novos fármacos, novas vacinas ou novos testes diagnósticos, ou qualquer projeto de pesquisa que envolva um problema que exija avaliação ética.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informado imediatamente à Comissão de Ética em Pesquisa da UNISUL.

Duas vias dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido deverão ser assinadas pelos responsáveis. Uma cópia deverá ser entregue aos responsáveis e a outra deverá ser mantida pelo pesquisador por um período de até cinco anos, conforme legislação.

Cordialmente,


Prof. Dra. Lúcia N. Amante
Coordenadora do CEP-UNISUL

Kozakevich, Gabriel Vilella

Recuperação de *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em aerossóis gerados pela tosse.- Florianópolis, 2012.
65pg

Orientador: Rosemeri Maurici da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina –
Bacharel em Medicina.

1.*Mycobacterium tuberculosis* 2. Protótipo 3.Diagnóstico 4.PCR

I. Recuperação de *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em aerossóis gerados pela tosse.