

VANESSA ROSÁLIA REMUALDO

**AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *Mycobacterium tuberculosis*
PRESENTE EM AMOSTRAS DE ESFREGAÇO BUCAL, PELA
TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

São Paulo
2009

Vanessa Rosália Remualdo

Amplificação do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* presente em amostras de esfregaço bucal, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior

São Paulo

2009

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Remualdo, Vanessa Rosália

Amplificação do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* presente em amostras de esfregaço bucal, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)/ Vanessa Rosália Remualdo; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2009.

66p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. *Mycobacterium tuberculosis* – Esfregaço bucal – Amplificação do DNA
2. Patologia bucal

CDD 617.63
BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Remualdo VR. Amplificação do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* presente em amostras de esfregaço bucal, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, 20/03/2008

Banca Examinadora

- 1) Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior
Titulação: Livre Docente – Universidade de São Paulo
Julgamento: _____ Assinatura: _____

- 2) Prof(a). Dr(a).
Titulação:
Julgamento: _____ Assinatura: _____

- 3) Prof(a). Dr(a).
Titulação:
Julgamento: _____ Assinatura: _____

- 4) Prof(a). Dr(a).
Titulação:
Julgamento: _____ Assinatura: _____

- 5) Prof(a). Dr(a).
Titulação:
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ajuda, apoio e confiança. Pode parecer frase pronta...

Mas quando falo de - e com - você, Paterno, essas palavras têm o exato significado que os dicionários trazem, e que o meu coração afaga...

Você me ajudou a descobrir do que realmente gosto...

Você me apoiou nesse redirecionamento profissional...

E confiou que tudo daria certo!

Obrigada pela paciência... pela grande paciência... Pela calma e tranquilidade quando tudo parecia estar confuso.

Esta tese é dedicada a você...

Ao meu orientador, Décio dos Santos Pinto Junior que, além de ter "apostado" em mim aceitando-me como orientanda, distinguiu-me com a sua amizade.

À querida amiga Renata Tucci... São tantas coisas para agradecer a você, Renata... Pelo auxílio na execução do trabalho, pela amizade, pelo carinho...

Ao maravilhoso time da Genolab: Ana Kelly, Diego, Franciele, Sandra, Dr. Amaury, Rubia, Sra. Anete, Camila, Fernanda e Paterno. Trabalhar com vocês é gratificante, e a tolerância com relação às minhas ausências - por força da execução deste trabalho - reforça a minha crença nas pessoas.

"Quero agradecer, por tanto que nem sei..."

Quero oferecer, tudo o que sei fazer"

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, que me recebeu tanto no Mestrado em Odontologia Legal quanto no Doutorado em Patologia Bucal.

Ao Laboratório Genolab, pelo pleno apoio na execução técnica deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – área de concentração em Patologia Bucal: Andréa Mantesso, Décio dos Santos Pinto Junior, Fabio Daumas Nunes, Francisco Fernando Todescan, Karem Lopez Ortega, Marília Trierveiler Martins, Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães e Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa. O Departamento de Estomatologia (ODE) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) muito deve à dedicação desses docentes, que mantêm a excelência do Programa de Pós-Graduação em Patologia Bucal.

Aos colegas da pós-graduação, pela valiosa troca de experiências na patologia bucal.

Aos meus familiares, Margareth (mãe), Ivany (avó), Laélío, em especial à minha mãe, que me apoiou e estimulou em todas as etapas da minha formação, sempre com sábias palavras e grande discernimento.

À Marieta, não apenas pela revisão deste trabalho, mas também pela amizade que se mantém desde o mestrado.

Remualdo VR. Amplificação do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* presente em amostras de esfregaço bucal, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente causador da tuberculose, doença responsável por 26% das mortes passíveis de prevenção no mundo todo. No Brasil, são notificados anualmente 85 mil casos novos, e estima-se que 50 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *M. tuberculosis*. A tuberculose é considerada prioritária para o controle de doenças e agravos pelo Ministério da Saúde. Para esse controle, é fundamental disponibilizar métodos e recursos para o pronto diagnóstico laboratorial. Os métodos utilizados para o diagnóstico da doença são bacterioscopia, análise histológica ou cultivo do micro-organismo a partir de amostras de escarro. A bacterioscopia apresenta baixa sensibilidade, e o resultado da cultura demanda um período de tempo de até oito semanas. A PCR é uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos que tem se mostrado promissor instrumento para o diagnóstico da tuberculose. O *M. tuberculosis* é um micro-organismo que tem tropismo pelas células (micro-organismo intracelular), e pode estar presente nas células do trato respiratório e da mucosa bucal. O esfregaço bucal, ao contrário do escarro, é obtido de forma fácil, sem constrangimentos, por procedimento não invasivo, e oferece menores riscos de contaminação por outros micro-organismos. Foram analisadas 80 amostras de esfregaço bucal de pacientes com diagnóstico confirmado de tuberculose, das quais 78 (97,4%) tiveram resultado positivo na PCR. Esse resultado permite concluir que a aplicação da PCR em amostras de esfregaço bucal é um método efetivo e confiável para detecção do *M. tuberculosis*.

Palavras-chave: tuberculose; PCR; *Mycobacterium tuberculosis*

Remualdo, VR. Amplification by PCR of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from oral swab [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is the causing agent of the tuberculosis, responsible illness for 26% of the prevention deaths in the entire world. In Brazil 85000new cases are notified annually, being esteem 50 million people contaminated by the *M. tuberculosis*. It is considered priority disease for the control of illnesses for the Health department. For this control, it has to be reliable methods and resources for the ready laboratorial diagnosis. Bacterioscopiv, histological analysis or culture of the microorganism from samples of sputum are techniques normally used. The limitation of these methods is low sensitivity and long-winded 8 weeks. The PCR is one technique of amplification of DNA, that if has shown promising instrument for the diagnosis of the tuberculosis. The *M. tuberculosis* is a microorganism that has affinity for the cells (intracellular microorganism) and can be present in the cells of the respiratory treat and the oral mucosa. Oral swab, in contrast of sputum, is easily taken, not invasive and offering lesser risks of contamination for other microorganisms. We analyze 80 samples of oral swab of patients with confirmed diagnosis of tuberculosis, of these, 78 (97,4%) had resulted positive in the PCR. We conclude that the oral swab use and the application of the PCR are an effective and trustworthy method for tuberculosis detention of the *M. tuberculosis*.

Keywords: tuberculosis; PCR; *Mycobaterium tuberculosis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Incidência mundial estimada de tuberculose em 2003	18
Figura 2.2 – Coloração de Ziel Neelsen. Os <i>M. tuberculosis</i> estão evidenciados na cor vermelha	25
Figura 2.3 – Cultura do micro-organismo: a identificação baseia-se no tempo de crescimento (lento, de 12 a 28 dias), na morfologia das colônias (rugosas) e na pigmentação (não cromogêneas)	28
Figura 2.4 – Teste tuberculínico em pele	31
Figura 5.1 – Gel de agarose 2%, amostras 1 a 8	47
Figura 5.2 – Gel de agarose 2%, amostras 9 a 16	47
Figura 5.3 – Gel de agarose 2%, amostras 17 a 24	48
Figura 5.4 – Gel de agarose 2%, amostras 25 a 32	48
Figura 5.5 – Gel de agarose 2%, amostras 33 a 40	49
Figura 5.6 – Gel de agarose 2%, amostras 41 a 48	49
Figura 5.7 – Gel de agarose 2%, amostras 49 a 56	50
Figura 5.8 – Gel de agarose 2%, amostras 57 a 64	50
Figura 5.9 – Gel de agarose 2%, amostras 65 a 72	51
Figura 5.10 – Gel de agarose 2%, amostras 73 a 80	51

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo
AIDS	do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> - síndrome da imunodeficiência adquirida
BAAR	bacilos-álcool-ácido-resistentes
BCG	bacilo de Calmette-Guérin
CMT	complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> "
DNA	do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
ELISA	do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> - ensaio imunoadsorvente enzima-associado
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HE	hematoxilina e eosina
HIV	do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i> - vírus da imunodeficiência humana
INH	isoniazida
kDA	Kilo Dalton
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> - reação em cadeia da polimerase
PPD	do inglês, <i>Purified Protein Derivative</i> – derivado de proteína purificada
PPD RT23	antígeno proteico purificado RT23
PZA	pirazinamida
RMP	rifampicina
RNA	do inglês, <i>ribonucleic acid</i> - ácido ribonucleico

rpm	rotação(ões) por minuto
SINAN/MS	Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde
TB	tuberculose
U	Unidade
UT	unidades de tuberculina
UV	ultra violeta
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

ml mililitro

μL microlitro

μL micro molar

% por cento

$^{\circ}\text{C}$ graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	TUBERCULOSE: CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
2.2	<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	21
2.3	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	25
2.3.1	Bacteriologia	25
2.3.1.1	Baciloscopia	25
2.3.1.2	Cultura	27
2.3.2	Anatomia Patológica	29
2.3.3	Exame Radiológico	30
2.3.4	Teste Tuberculínico (<i>Purified Protein Derivative – PPD</i>)	31
2.3.5	Procedimentos Moleculares	32
2.4	MANIFESTAÇÕES BUCAIS DA TUBERCULOSE	39
3	PROPOSIÇÃO	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	41
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA	41
4.3	PCR	43
4.4	PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR	44
5	RESULTADOS	46
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), patologia causada pela micobactéria gram-positiva *Mycobacterium tuberculosis*, é responsável por 26% das mortes passíveis de prevenção no mundo todo (BLOOM; MURRAY, 1992; RAVIGLIONE; SNIDER; KOCHI, 1995). De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN/MS), 85 mil novos casos de tuberculose são notificados anualmente no Brasil, a maioria com diagnóstico apenas clínico ou epidemiológico. Destes, cerca de seis mil vêm a óbito por ano em decorrência da doença, ainda que o tratamento ofereça 97% de eficácia (BRASIL, 2002). A tuberculose atinge todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos na faixa de 15 a 54 anos de idade (BRASIL, 2005).

O Brasil integra o grupo dos 22 países em desenvolvimento que contribuem com 80% da ocorrência de novos casos de tuberculose no mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), dois bilhões de pessoas – número que corresponde a um terço da população mundial - estão infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Destas, 8 milhões desenvolverão a doença e 2 milhões morrerão a cada ano (BRASIL, 2002). Além disso, o número de casos da doença em humanos tem aumentado nas últimas décadas em virtude do crescimento populacional de indivíduos imunocomprometidos, seja devido à síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* - AIDS), à quimioterapia ou aos transplantes de órgãos (BRASIL, 2000).

A tuberculose é considerada, pelo Ministério da Saúde (MS), patologia prioritária para o controle de doenças e agravos do trato respiratório no Brasil. Mas,

para que esse controle seja efetivo, faz-se necessário disponibilizar métodos e recursos que possibilitem o pronto diagnóstico - tanto clínico quanto laboratorial - da infecção (BRASIL, 2000).

O diagnóstico da tuberculose é tradicionalmente confirmado pelo achado do *Mycobacterium tuberculosis* no escarro ou em amostras de líquidos e tecidos orgânicos. Além da baciloscopia, frequentemente utilizada porém pouco sensível, o método considerado de referência para o diagnóstico da tuberculose é a cultura, que não provê a rapidez desejada – pode levar até 8 semanas para fornecer subsídios laboratoriais para o diagnóstico da infecção (SOINI; MUSSER, 2001).

Assim sendo, a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em esfregaços bucais por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) pode se constituir em um método de diagnóstico mais rápido do que a cultura e mais sensível do que a baciloscopia. Além disso, há que se considerar que o escarro, referência para o diagnóstico da tuberculose, é uma amostra biológica que causa constrangimento tanto ao paciente que a fornece quanto ao profissional que procederá à análise.

A técnica de PCR é utilizada em amostras biológicas de biópsias de granulomas, sangue periférico, medula óssea, punção pleural, saliva e esfregaço bucal, dentre outras. Além de não provocar constrangimentos, a obtenção do *swab* bucal não requer procedimentos invasivos e oferece menores riscos de contaminação.

A exposição até aqui realizada não só destaca a importância da investigação de métodos de diagnóstico mais sensíveis e rápidos para a detecção da tuberculose humana, como sugere a adoção de procedimentos menos constrangedores e mais seguros para a obtenção de amostras que subsidiem tais estudos. Portanto, o

presente trabalho avaliou a sensibilidade da PCR para detectar o ácido desoxirribonucleico (DNA) de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de esfregaço bucal de pacientes com diagnóstico confirmado de tuberculose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TUBERCULOSE: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Mais de um bilhão de pessoas estão infectadas pelo *M. tuberculosis* no mundo, e anualmente ocorrem 8 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes causadas pela moléstia. Após o surgimento da antibioticoterapia, nos anos 40 do século XX, houve uma diminuição abrupta no número de casos da doença, mas a epidemia de AIDS, o aumento dos movimentos migratórios de populações provenientes de países em que a tuberculose é endêmica, a transmissão em situações de insalubridade, e o declínio da infraestrutura de saúde pública têm tido implicações em seu recente ressurgimento (BRASIL, 2000).

Há relatos de evidência de tuberculose em ossos humanos pré-históricos, datados de 8.000 anos a.C., encontrados na Alemanha. Já se descreviam lesões de tubérculos nas múmias do Egito, e documentos antigos das civilizações hindu e chinesa relatam quadros de uma doença pulmonar muito semelhante à tuberculose. A mudança de vida das populações humanas, que abandonaram a vida nômade para se fixar em vilas e conglomerados, fez com que o número de casos dessa doença pulmonar aumentasse (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

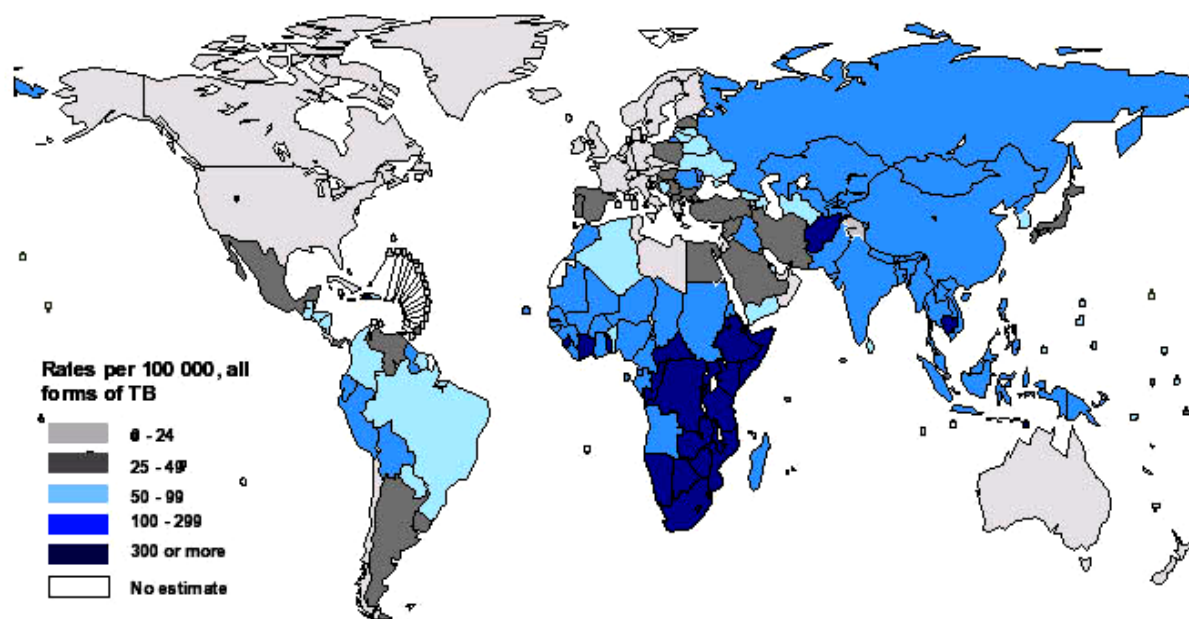
Com os deslocamentos humanos decorrentes das guerras, das conquistas e do comércio, a doença foi se espalhando pelo mundo, e atingiu o apogeu na Europa, no século XVII. No período da Revolução Industrial, que promoveu o êxodo rural, a

aglomeração de pessoas nas cidades, a pobreza e a elevação das taxas de mortalidade, foi denominada “Peste Branca”. Até 1940, o tratamento da tuberculose consistia, basicamente, em repouso e boa alimentação (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

A descoberta dos quimioterápicos trouxe a possibilidade de cura aos portadores da moléstia. Entretanto, embora a morbidade e a mortalidade tenham diminuído mundialmente, a tuberculose ainda se constitui em um grande problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000; KUMAR et al., 2005)

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a TB como emergência mundial, com base em cálculos que apontavam a existência de um bilhão e 700 milhões de pessoas infectadas. Nesse contexto, e juntamente com China, Índia, Filipinas, Paquistão, Indonésia e Nigéria, o Brasil se insere entre os 15 países com maior número de casos de tuberculose no mundo, com aproximadamente 85.000 novos casos, e 6.000 óbitos por ano, como demonstram a figura 2.1 e a tabela 2.1 (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2004).

Estimated TB incidence rate, 2003



Fonte: WHO, 2004

Figura 2.1 - Incidência mundial estimada de tuberculose em 2003

Tabela 2.1 - Incidência, prevalência e mortalidade da tuberculose nos países do mundo

	POPULATION 1000s	INCIDENCE				PREVALENCE		MORTALITY	
		ALL CASES		SMEAR-POSITIVE CASES		ALL FORMS OF TB, INCLUDING IN HIV-INFECTED PEOPLE			
		NUMBER 1000s	RATE PER 100 000 POR	NUMBER 1000s	RATE PER 100 000 POR	NUMBER 1000s	RATE PER 100 000 POR	NUMBER 1000s	RATE PER 100 000 POR
1 India	1 065 462	1 788	168	798	75	3 086	290	352	33
2 China	1 304 196	1 334	102	600	46	3 203	246	236	18
3 Indonesia	219 883	627	285	282	128	1 484	675	143	65
4 Nigeria	124 009	363	293	156	126	677	546	105	85
5 Bangladesh	146 736	361	246	162	111	719	490	84	57
6 Pakistan	153 578	278	181	125	82	551	359	67	43
7 Ethiopia	70 678	252	356	109	155	377	533	56	79
8 South Africa	45 026	242	536	98	218	206	458	33	73
9 Philippines	79 999	237	296	107	133	366	458	39	49
10 Kenya	31 987	195	610	84	262	283	884	43	133
11 DR Congo	52 771	195	369	85	160	298	564	43	81
12 Russian Federation	143 246	161	112	72	50	229	160	29	20
13 Viet Nam	81 377	145	178	65	80	195	240	19	23
14 UR Tanzania	36 977	137	371	58	157	194	524	32	86
15 Brazil	178 470	110	62	49	28	164	92	15	8
16 Uganda	25 827	106	411	46	179	168	652	25	96
17 Thailand	62 833	89	142	40	63	130	208	12	19
18 Mozambique	18 863	86	457	36	190	120	636	24	129
19 Zimbabwe	12 891	85	659	34	265	85	660	20	153
20 Myanmar	49 485	85	171	38	76	92	187	12	25
21 Afghanistan	23 897	80	333	36	150	160	671	22	93
22 Cambodia	14 144	72	508	32	225	108	762	13	95
High-burden countries	3 942 338	7 027	178	3 112	79	12 896	327	1 423	36

Fonte: WHO, 2004

No Brasil, as estratégias para o controle da tuberculose emanam do governo federal e constituem-se em programas governamentais. Os focos essenciais e primeiros desses programas são o diagnóstico e o tratamento rápidos da infecção, a fim de interromper a cadeia de transmissão e, conseqüentemente, evitar a disseminação da doença. O tratamento da TB consiste na administração de um conjunto de fármacos - geralmente isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA) - durante dois meses, ao final dos quais mantém-se a administração de INH e RMP por quatro meses. Intercorrências - como monoterapia, prescrição imprópria da associação de fármacos ou falta de colaboração do paciente no seguimento desse esquema terapêutico - podem promover o surgimento de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos (ROSSETI et al., 2002) utilizados, o que contribui para aumentar a proporção de óbitos por TB (SNIDER; ROPER, 1992).

Muniz et al. (2006) comentam que, com o surgimento da AIDS em 1981, tem-se observado, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, o crescimento do número de casos notificados de tuberculose em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). No ano de 2000, aproximadamente 11% dos casos de TB em adultos ocorreram em indivíduos infectados pelo HIV ou com AIDS (FRIEDEN et al., 2003).

Como ressaltam Lima et al. (1997), muitos são os estudos que demonstram que indivíduos infectados pelo HIV apresentam risco de adoecimento muito maior do que indivíduos não infectados por esse vírus. Mas, a despeito dessa evidência, a busca sistemática por soropositivos entre os tuberculosos não é realizada. Assim, e com vistas a incrementar a descoberta de casos e fornecer maior subsídio à vigilância da coinfeção, os autores sugerem a realização rotineira do teste anti-HIV

por ocasião do diagnóstico de tuberculose, desde que mantido o sigilo da informação.

Garcia et al. (2000) verificaram a prevalência de coinfeção tuberculose/HIV, e a acuidade da anamnese na detecção de infecção pelo HIV em pacientes internados por TB no Hospital Eduardo de Menezes - Belo Horizonte (MG) -, referência para TB e AIDS. Para tanto, procederam à avaliação prospectiva dos pacientes internados por tuberculose na Enfermaria de Pneumologia daquela instituição no período de 1/1/1997 a 31/1/1998, dirigindo a anamnese para fatores de risco para AIDS e TB, tratamentos anteriores e abandonos de tratamento para TB, além de verificarem as formas clínicas de TB. Foram excluídos pacientes com doenças marcadoras de AIDS - com exceção da tuberculose -, ou com sorologia anti-HIV realizada anteriormente. Foram realizadas sorologias anti-HIV, como o ensaio imunoadsorvente enzima-associado (ELISA) que, quando positivas, foram submetidas à confirmação pelo teste *Western-Blot*. Os 65 pacientes avaliados foram divididos em grupo I (sorologia positiva para HIV, n = 6) e grupo II (sorologia negativa para HIV, n = 59). De acordo com os resultados, não houve diferença significativa entre os dois grupos quanto a fatores de risco para AIDS, TB, abandono de tratamento ou tratamentos anteriores para TB e formas clínicas de TB. Os autores concluem que, devido à alta prevalência de infecção pelo HIV (9,2%) no grupo estudado, os resultados obtidos reforçam as postulações do Consenso Brasileiro de Tuberculose, que afirma que a anamnese não é suficientemente acurada para detectar a coinfeção TB/HIV em parcela significativa dos indivíduos acometidos, e sugere a solicitação rotineira de sorologia anti-HIV para todos os pacientes com TB ativa.

Sabe-se que aproximadamente 30% dos pacientes com HIV positivo ou com AIDS apresentam coinfeção pela TB. Em estudo conduzido na região Nordeste do Brasil - no qual foram coletados dados de prontuários de pacientes maiores de 15 anos com diagnóstico de AIDS atendidos em hospital de referência estadual -, Kerr-Pontes, Oliveira e Freire (1997) constataram tuberculose em 30,6% (151/493) da amostra, e diagnóstico positivo para essa moléstia, até o primeiro ano após o diagnóstico da AIDS, em 76,8% dos casos analisados. Além disso, os autores constataram proporcionalidade inversa entre o acometimento pela tuberculose e o nível de escolaridade. Essa proporcionalidade, de significância estatística ($<0,001$), revelou que, na região na qual a investigação foi conduzida, o número de pacientes HIV positivos que desenvolvem tuberculose é maior nos segmentos de menor escolaridade.

O combate à tuberculose é uma das prioridades da OMS em seu objetivo geral, que preconiza “ações para uma vida mais saudável” (WHO, 2004). Dentre as metas do milênio iniciado em 2001, aquela organização elenca a redução da incidência e da mortalidade por tuberculose à metade até o ano de 2015 e, a longo prazo, a eliminação da doença do rol dos problemas de saúde pública até o ano de 2050.

2.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

O *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico da tuberculose, forma, juntamente com o *Mycobacterium bovis*, o *Mycobacterium africanum* e o

Mycobacterium microti, o COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). Embora apresentem variações de patogenicidade, alcance geográfico, fatores fisiológicos, epidemiologia e afinidade de hospedeiros, os membros do CMT são micobactérias cuja sequência de nucleotídios é caracteristicamente homogênea (CHIMARA; FERRAZOLI; LEÃO, 2004). As bactérias do gênero *Mycobacterium* são bastonetes aeróbios delgados, que crescem em cadeias ramificadas ou retas e apresentam parede celular serosa - composta de ácido micólico -, o que as torna acidorresistentes. Por esse motivo, retêm corantes mesmo quando submetidas a compostos de ácido e álcool. As micobactérias apresentam coração fracamente positiva com o corante GRAM (COLLINS, 2005).

A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* ocorre pela inalação de gotículas de aerossóis provenientes de secreções de pacientes com a doença em atividade - contendo micro-organismos viáveis - por indivíduos susceptíveis à doença. O período de incubação da tuberculose varia, em média, de 4 a 12 semanas até a descoberta das primeiras lesões. Grande parte dos novos casos de doença pulmonar ocorre por volta de 12 meses após a infecção inicial (BRASIL, 2005).

A patogênese da tuberculose em pessoa imunocompetente que não tenha sido anteriormente exposta à infecção depende da imunidade mediada por células antimicobactérias, que confere resistência às bactérias e resulta no desenvolvimento de hipersensibilidade aos antígenos tuberculosos. As manifestações patológicas da tuberculose, como os granulomas caseificados e a cavitação, são resultados da hipersensibilidade - que é parte e parcela da resposta imune do hospedeiro (KUMAR et al., 2004).

Segundo a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), um indivíduo que recebe pela primeira vez uma carga infecciosa de bacilos da TB (primoinfecção), dos quais um ou dois alcançam os pulmões - vencendo as defesas da árvore respiratória e localizando-se nos alvéolos da periferia pulmonar -, apresentará reação inflamatória e exsudativa inespecífica. Em 15 dias, os bacilos podem se multiplicar livremente - porque ainda não existe imunidade adquirida - e alcançar número maior do que 10^5 e, partindo da lesão pulmonar, atingirão a via linfo-hematogênica, comprometendo órgãos distantes como fígado, baço, rins, mucosa oral e sistema nervoso central. Nessa disseminação, poucos bacilos ficarão latentes ou serão destruídos pela ação da imunidade (BRASIL, 2002).

No início da terceira semana, o organismo - reconhecendo a presença do elemento estranho - é capaz de mobilizar o sistema imunológico específico. No local da inoculação inicial desenvolve-se um foco pequeno e arredondado, de 1-2mm, de consistência amolecida e constituído por material caseoso, circundado por afluxo celular de linfócitos e macrófagos, acometendo principalmente o ápice do lobo inferior. À associação do foco primário aos gânglios satélites da sua região dá-se o nome de Complexo Primário de Ranke. O foco pulmonar regressivo visto em radiografias chama-se foco de Gohn. Cerca de 95% das pessoas infectadas conseguem bloquear o avanço do processo a partir da formação do complexo primário, permanecendo apenas como infectadas (BRASIL, 2000).

A tuberculose primária é a forma da doença que se desenvolve previamente em pessoa não exposta e, portanto, não sensibilizada. Aproximadamente 5% das pessoas recém-infectadas desenvolvem doença clinicamente significativa. Idosos e pessoas imunocomprometidas podem perder a imunidade aos bacilos e, assim, desenvolver a tuberculose primária mais uma vez (BRASIL, 2000).

A tuberculose secundária é um padrão da doença que surge em hospedeiros previamente sensibilizados. Pode surgir pouco depois da tuberculose primária, porém, com maior frequência, ocorre pela reativação das lesões primárias latentes muitas décadas após a infecção inicial, particularmente quando a resistência do hospedeiro estiver enfraquecida. Também pode resultar de reinfecção exógena, seja porque a proteção provida pela doença primária diminuiu, seja por inoculação de grande quantidade de bacilos virulentos. A reativação da tuberculose é mais comum em áreas de baixa prevalência, enquanto a reinfecção desempenha um papel importante em regiões de alto contágio. Existem outros tipos mais agressivos de TB, como a TB pulmonar progressiva e a TB miliar sistêmica (BRASIL, 2000).

Os sintomas mais frequentemente vistos em pacientes com TB são: tosse produtiva contendo ou não hemoptise, falta de apetite, emagrecimento, febre, suores noturnos, indisposição e mal estar (BRASIL, 2004). Em quadros de tosse produtiva que perdure além de quatro semanas, recomenda-se que o paciente procure um médico para avaliação, diagnóstico e tratamento adequados.

O tratamento da tuberculose visa eliminar todos os bacilos tuberculosos, uma vez que não permite anular rapidamente as maiores fontes de infecção. O tratamento deve ser feito no ambulatório, com supervisão no serviço de saúde mais próximo, na residência ou no trabalho do doente. Para assegurar a cura, é necessário que seja feita uma associação medicamentosa adequada em doses corretas, utilizada durante período de tempo suficiente, sob supervisão (BRASIL, 2000).

Para o diagnóstico da tuberculose são utilizados os seguintes métodos laboratoriais: bacterioscópico (baciloscopia e cultura), radiológico, prova

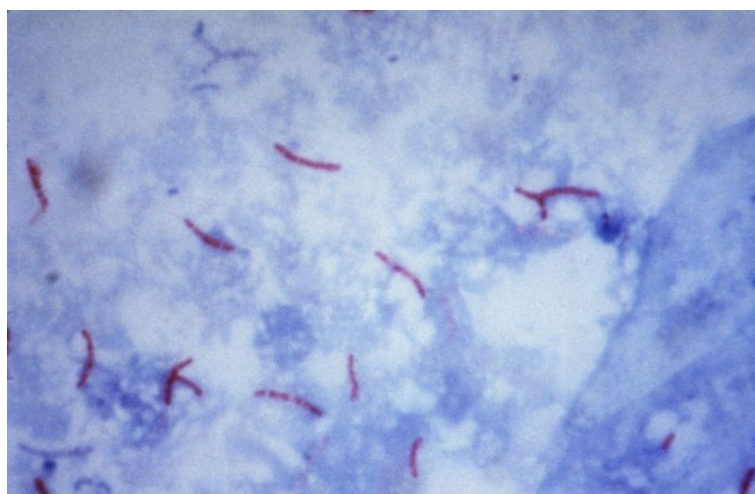
tuberculínica, anatomopatológico (cito e histopatológico), bioquímico e de biologia molecular, apresentados mais detalhadamente a seguir.

2.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

2.3.1 Bacteriologia

2.3.1.1 Baciloscopia

A baciloscopia é um método que identifica os bacilos diretamente do escarro. Os métodos de colorações específicos para micobactérias são o Ziehl-Neelsen, mais convencional, que detecta bacilos-álcool-ácido-resistentes (BAAR) – como demonstra a figura 2.2 –, e a técnica do fluorocromo, na qual se utiliza audamina-rodamina (LIMA, 2001).



Fonte: Tambe, 2008

Figura 2.2 - Coloração de Ziehl Neelsen. Os *M. tuberculosis* estão evidenciados na cor vermelha

A coloração de Ziehl-Neelsen é um método diagnóstico rápido e barato, eleito pelos serviços de saúde pública. No entanto, apresenta limitações, pois a positividade do exame só é alcançada com uma contagem significativa de BAAR (5.000cm^3), o que implica grande possibilidade de resultados falso-negativos. A negatividade desse método diagnóstico pode ocorrer em estágios iniciais da doença, pois o bacilo apresenta crescimento lento, ou em indivíduos que mantenham níveis de infecção controlada (FERREIRA et al., 2005).

O método do fluorocromo é mais sensível e mais rápido do que o Ziehl-Neelsen e permite a observação de maior número de campos microscópicos, pois pode ser lido com objetivas de menor aumento. Por outro lado, apresenta menor especificidade e requer um microscópio de fluorescência, equipamento caro e não disponível em grande parte dos laboratórios brasileiros (BRASIL, 2002; LIMA, 2001). O corante utilizado nesse método é a auramina fenólica ou a auramina-rodamina. Depois da descoloração com ácido álcool e recoloração com azul de metileno, o bacilo aparece de cor amarela e brilhante contra um fundo escuro.

Nogueira (2004) realizou um estudo retrospectivo e descritivo visando analisar as associações entre a baciloscopia e as variáveis sexo, faixa etária, unidade de saúde, exame radiológico do tórax, motivo clínico ou social da internação e o tipo de saída do hospital. Entre os internados, 35.510 (95,5%) apresentaram a forma pulmonar da doença, e 25.477 (71%) haviam realizado a baciloscopia de escarro. O autor observou resultado positivo em 79,4% dos indivíduos avaliados, dos quais 79,6% eram do sexo masculino. Os internados por falência de tratamento foram os que tiveram maior positividade (91,2%). Em relação ao tempo de internação, quanto maior a permanência, maior a positividade da baciloscopia. Concluiu que a baciloscopia é essencial para a internação de doentes com

tuberculose, pois evita internações equivocadas, e enfatiza a necessidade de atenção especial em relação aos pacientes positivos, para que não ocorram saídas indesejadas e longos períodos de internação.

Assim como o autor anteriormente citado, Ferreira et al. (2005) verificaram os principais fatores associados à tuberculose pulmonar e os resultados da baciloscopia em 189 prontuários de pacientes com idade acima de 25 anos atendidos no Hospital Giselda Trigueiro, localizado em Natal (RN), no período de 2000 a 2002. Nesse estudo, a baciloscopia, realizada em 84,1% dos integrantes da amostra, foi positiva em 55,3%, e negativa em 44,7% dos casos. O índice de positividade, um pouco inferior àquele encontrado no trabalho anteriormente mencionado, pode refletir a baixa sensibilidade do método.

2.3.1.2 Cultura

A cultura permanece como método padrão para o diagnóstico da tuberculose. É indicada para casos suspeitos de tuberculose pulmonar persistentemente negativos à baciloscopia, e também para o diagnóstico de formas extrapulmonares da doença, como a meníngea, a renal, a pleural, a óssea e a ganglionar. Além disso, está indicada para casos em que haja suspeita de resistência bacteriana às drogas, acompanhada de teste de sensibilidade (BRASIL, 2000). O período de crescimento típico é de 4 a 6 semanas (Figura 2.3). Somente após esse período o diagnóstico é confirmado, o que pode influenciar no controle da endemia, pois o diagnóstico precoce interrompe o ciclo de transmissão da doença

(FERREIRA et al., 2005). O *M. tuberculosis* cresce a 37°C em 5 a 10% de CO₂. Ensaio bioquímico - como crescimento em niacina, teste de redução ao nitrato positivo e análise cromatográfica líquida de alto desempenho - podem ser utilizados para distinguir o *M. tuberculosis* de outros integrantes do complexo quando os métodos moleculares não são específicos. Resultados falso-positivos podem ocorrer devido à contaminação do laboratório ou identificação de um *Mycobacterium* atípico (BRETT-MAJOR; WALSH, 2006).



Fonte: Rodrigues e Pinto, 2004

Figura 2.3 - Cultura do micro-organismo: a identificação baseia-se no tempo de crescimento (lento, de 12 a 28 dias), na morfologia das colônias (rugosas) e na pigmentação (não cromogêneas)

Com o objetivo de reduzir o tempo de diagnóstico da tuberculose, tecnologias para a detecção precoce do crescimento de micobactérias têm sido desenvolvidas desde o final dos anos 70. Dentre os equipamentos destinados à cultura para diagnóstico da tuberculose, incluem-se o BACTEC 460TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, Md.), radiométrico, e o BBL-Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT - Becton Dickinson Instruments, Sparks, Md.), não-radiométrico. Com tais equipamentos, que detectam o *Mycobacterium tuberculosis* por meio do metabolismo desse organismo na cultura - liberação de metabólitos -

ganha-se tempo no diagnóstico, pois não há necessidade de aguardar o crescimento bacteriano completo.

Enquanto no sistema radiométrico o crescimento bacteriano é constatado pela detecção do gás carbônico - marcado com carbono 14 - emitido, no sistema não radiométrico essa constatação se dá pela detecção do consumo de oxigênio por fluorescência (GRANGE, 1999).

2.3.2 Anatomia Patológica

O diagnóstico da tuberculose pulmonar é feito de maneira rápida e segura através da baciloscopia do escarro. Entretanto, 30% a 50% dos portadores de tuberculose pulmonar apresentam baciloscopia de escarro negativa ou não têm escarro, o que torna necessária a realização de biópsia transbrônquica, método de coleta realizado por fibrobroncoscopia e de grande sensibilidade para o diagnóstico da TB (CAYMMI et al., 2004). Além do estudo anatomopatológico do fragmento da biópsia, que pode fornecer o diagnóstico imediato da tuberculose, essa técnica possibilita o diagnóstico de outras doenças, de variadas etiologias (BAMMANN et al., 1999; CAYMMI et al., 2004).

De acordo com Leão e Gonçalves (2008), a principal vantagem da broncoscopia na avaliação de infiltrados pulmonares é a possibilidade de descartar outras doenças infecciosas. Sendo assim, quando da suspeita de etiologia infecciosa, a broncoscopia é a primeira opção se comparada à biópsia em céu aberto, pois se constitui em um método pouco invasivo e de baixo custo. A análise

do lavado broncoalveolar oferece subsídios para o diagnóstico de diferentes patologias, em especial aquelas de etiologia bacteriana, fúngica e micobacteriana.

Ao exame do fragmento de biópsia, observa-se que histologicamente os locais de envolvimento ativo são marcados por reação inflamatória granulomatosa característica, que forma os tubérculos caseificados e não-caseificados. Os granulomas apresentam células gigantes multinucleadas e, com frequência, são circunscritos por uma borda fibroblástica pontuada por linfócitos (COLLINS, 2005).

2.3.3 Exame Radiológico

O exame radiológico é utilizado em pacientes que apresentam sintomas respiratórios e resultados negativos à baciloscopia direta, em comunicantes sem sintomatologia respiratória de todas as idades, em casos em que há suspeita de tuberculose extrapulmonar e em portadores do HIV ou pacientes com AIDS. Os exames radiológicos são classificados da maneira que segue:

- Normal: não apresenta imagens patológicas nos campos pulmonares;
- Sequela: apresenta imagem sugestiva de lesões cicatriciais;
- Suspeito: apresenta imagem sugestiva de processo tuberculoso ativo;
- Outras doenças: apresenta imagem sugestiva de pneumopatia não tuberculosa.

Quando o exame radiológico apresenta imagens sugestivas de tuberculose (suspeito), é indispensável submeter o indivíduo ao exame bacteriológico para o estabelecimento do diagnóstico correto (BRASIL, 2000).

2.3.4 Teste Tuberculínico (*Purified Protein Derivative – PPD*)

O teste tuberculínico é indicado como método auxiliar de diagnóstico da tuberculose em pessoas não vacinadas contra a tuberculose - bacilo de Calmette-Guérin (BCG). A prova tuberculínica positiva, isoladamente, indica apenas infecção e não basta para o diagnóstico da TB doença. O antígeno utilizado, ou tuberculina, é o antígeno proteico purificado RT23 (PPD RT23), aplicado por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo (Figura 2.4), na dose de 0,1ml, equivalente a 2 unidades de tuberculina (UT). O resultado do teste é classificado segundo o tamanho do nódulo, e registrado da maneira que segue (BRASIL, 2002):

- 0 a 4mm - não reator: indivíduo não infectado pelo bacilo da tuberculose ou analérgico;
- 5 a 9mm - reator fraco: indivíduo infectado pelo bacilo da tuberculose ou por outras micobactérias;
- maior ou igual a 10mm - reator forte: indivíduo infectado pelo bacilo da tuberculose, que pode estar doente ou não.



Fonte: Adam, 2008a e 2008b (Adaptação da autora)

Figura 2.4 - Teste tuberculínico em pele

A despeito de sua grande sensibilidade, o teste tuberculínico apresenta limitação para o diagnóstico da TB, pois é pouco específico e incapaz de diferenciar o indivíduo com enfermidade ativa daquele infectado por *M. tuberculosis* ou outras micobactérias (BRASIL, 2005; LIMA, 2001).

Assim, em casos de suspeita, outros exames já citados são utilizados para oferecer ao paciente conduta e tratamento adequados (BRASIL, 2002).

2.3.5 Procedimentos Moleculares

A partir dos anos 50, com a descoberta da estrutura do DNA, surgiu uma nova ciência, a biologia molecular, ferramenta de indiscutível utilidade no diagnóstico de doenças infecciosas pois permite a identificação da sequência gênica específica do agente causador de uma determinada doença em material biológico obtido do paciente.

Assim, e diante da já antiga necessidade de um teste rápido para o diagnóstico laboratorial da tuberculose, os estudiosos do assunto dedicaram-se a investigações voltadas ao conhecimento do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*, e identificaram sequências de DNA ou RNA que permitiriam caracterizar a presença desse micro-organismo em material biológico obtido do paciente (MELLO; COSTA, 2005; SPADA et al., 2005). Dentre as técnicas moleculares utilizadas para a detecção e a identificação do *M. tuberculosis*, destacou-se a reação em cadeia da polimerase (MELLO; COSTA, 2005).

O princípio básico da PCR consiste na amplificação de uma região selecionada de DNA de fita simples ou dupla, ou de RNA. A amostra a ser amplificada – sequência-alvo de um determinado gene ou parte dele - constitui uma sequência de bases previamente conhecida. O conhecimento dessa sequência permite a síntese dos oligonucleotídeos que serão os iniciadores da PCR, também denominados *primers* (MELLO; COSTA, 2005).

Dois conjuntos de *primers* de DNA, escolhidos para flanquear a sequência de nucleotídeos desejada do gene, são sintetizados por meios químicos. Esses *primers* são utilizados para iniciar a síntese de DNA nas fitas simples, geradas pelo aquecimento do DNA do genoma inteiro. O novo DNA sintetizado é produzido em uma reação catalisada *in vitro* por uma DNA polimerase purificada, e os *primers* permanecem nas extremidades 5' dos fragmentos finais produzidos (HANCE et al., 1989).

A eficácia da PCR é revelada somente depois de repetidos ciclos de síntese de DNA. Cada ciclo duplica a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior. Os novos fragmentos gerados em cada ciclo da síntese de DNA servem como moldes e, dentro de poucos ciclos, o produto predominante é uma única espécie de fragmento de DNA, cujo comprimento corresponde à distância entre os dois iniciadores originais (HANCE et al., 1989).

A PCR, cuja acuidade é determinada pela escolha do DNA-alvo e pela definição dos *primers* dentro da sequência desse mesmo DNA, vem sendo utilizada como alternativa de grande sensibilidade e especificidade para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas (OGUSKU; SALEM, 2004).

Os resultados da aplicação da PCR na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* são variáveis, principalmente no que diz respeito à sensibilidade

(MONTENEGRO et al., 2003; SHINGADIA; NOVELLI, 2003). Por essa razão, várias sequências-alvo têm sido utilizadas, tais como: IS6110, 65 kDa (GroEL), 38 kDa (PhoS, CIE Ag78 ou Pab) e MPB64 (23 kDa). Dentre estas, a IS6110 é a mais comumente usada por ser uma sequência repetitiva no genoma do *M. tuberculosis*.

Em 1990, Eisenach et al. sintetizaram um par de iniciadores que amplificou um fragmento presente em uma sequência repetitiva (IS6110) do DNA do *Mycobacterium tuberculosis*, o que torna a PCR mais sensível do que quando utilizada na amplificação de sequências únicas de DNA. O produto amplificado, um fragmento de 123 pares de base (pb), foi detectado pela técnica da PCR apenas nas amostras de cepas de *M. tuberculosis* e *M. simiae*. Os autores enfatizam que a sensibilidade da técnica da PCR está diretamente relacionada com o número de cópias da sequência IS6110 contidas no genoma do *M. tuberculosis* - em média de 6 a 20 cópias. A sequência da inserção IS6110 tem significado funcional desconhecido, pois não é um gene: ela pertence à classe de moléculas conhecidas como transposons, que são fitas de DNA capazes de auto-replicação e podem estar permanentemente integradas ao genoma do hospedeiro.

A Reação em Cadeia da Polimerase para o *M. tuberculosis* tem sido utilizada em amostras de escarro, medula óssea (ESCOBEDO-JAIMES et al., 2003; OKUDA et al., 2003), fígado (AKCAN et al., 1997), aspirados de nódulos pulmonares (CHIN et al., 1995; SALIAN et al., 1998) e amostras de sangue periférico (CONDOS et al., 1996; SCHLUGER et al., 1994), dentre outras.

Kox et al. (1994) utilizaram amostras de sangue, escarro, biópsias, fluido cérebro-espinhal, fluido pleural, fluido de fístula, fezes e pus para detectar o DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em casos de tuberculose já confirmados pela técnica de cultura, considerada padrão-ouro para o diagnóstico da doença. Os autores, que

relatam que o DNA de *Mycobacterium tuberculosis* foi amplificado em todas as amostras utilizadas, concluíram que a técnica de PCR pode ser utilizada para o diagnóstico da doença em amostras oriundas de diversos sítios.

Para verificar a presença das sequências de DNA-alvo mais mencionadas na literatura para o diagnóstico da tuberculose em amostras clínicas, Ogusku e Salem (2004) utilizaram as respectivas cepas de *M. tuberculosis* isoladas como controle positivo. Oitenta e uma amostras clínicas de pacientes foram submetidas à baciloscopia e ao cultivo. A técnica de PCR foi realizada nas amostras clínicas e em cepas isoladas, com *primers* específicos para os alvos IS6110, 65kDa, 38kDa e MPB64. Em 24 amostras com baciloscopia e cultivo negativos, a PCR também foi negativa para todos os *primers* testados. Em 19 amostras com baciloscopia positiva e nas cepas isoladas a PCR apresentou 100% de resultados positivos na PCR, à exceção das PCR realizadas com o *primer* MPB64 (89,4%). Nas 38 amostras com baciloscopia negativa e cultivo positivo as PCR tiveram resultados variáveis, sendo que os *primers* específicos - que amplificam o fragmento de 123 pb da sequência IS6110 - foram os que forneceram os maiores percentuais de positividade (92,1%), concordância diagnóstica (0,9143), copositividade (94,7%) e conegatividade (100%).

Parashar et al. (2006) publicaram um artigo de revisão sobre a aplicação da tecnologia de PCR em tempo real para a pesquisa de micobactérias. Segundo os autores, a PCR em tempo real é uma técnica promissora para a detecção, a quantificação, a diferenciação das espécies e a detecção da resistência às drogas em infecções por micobactérias.

Para verificar a eficiência da PCR no diagnóstico da tuberculose pulmonar, Querol et al. (1995) amplificaram o fragmento de 123 pb da sequência IS6110. Os autores avaliaram 314 amostras de 242 pacientes pela PCR, e os resultados foram

comparados àqueles obtidos na coloração, na cultura e no diagnóstico clínico. O *Mycobacterium tuberculosis* foi detectado por PCR em 102 dos 105 pacientes com diagnóstico clínico de tuberculose pulmonar. Todos os casos de coloração-positivos cultura-positivos foram também PCR-positivos. A sensibilidade da PCR, da cultura e da coloração, quando comparadas ao diagnóstico clínico, foi de 97%, 88% e 65%, respectivamente, e a sensibilidade da PCR em comparação com os outros métodos foi de 100%. Em 10 pacientes com lesões residuais antigas, porém sem doença ativa, o genoma do *Mycobacterium tuberculosis* foi detectado por PCR. Diante dos resultados obtidos, os autores concluíram que a PCR é um método a ser utilizado para o rápido diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Santos, Kipnis e Kipnis (2007) avaliaram a acurácia dos métodos bacteriológicos e da técnica de PCR - com *primers* específicos para a região IS6110 - em amostras de escarro de indígenas e não-indígenas. Foram analisadas 214 amostras de escarro (154 de pacientes indígenas e 60 de não indígenas) para determinar a acurácia das técnicas de microscopia, cultura e reação em cadeia da polimerase. A microscopia demonstrou baixa sensibilidade quando comparada com a cultura e a PCR. A especificidade da PCR variou de 91% a 100%.

Em 1991, Pierre et al. utilizaram a PCR-Nested - amplificação do fragmento-alvo em duas etapas - para detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras biológicas. A sensibilidade da PCR-Nested foi 63% superior à da cultura, e também superior à da PCR em uma só etapa.

Embora a maioria dos autores enfatize a eficácia da PCR na detecção do DNA do *M. tuberculosis*, Suffys et al. (2000) desenvolveram um estudo para avaliar a eficiência dessa técnica em seis diferentes laboratórios situados na América Latina. Para tanto, quantidades definidas e idênticas das mesmas amostras foram

distribuídas aos laboratórios eleitos. Cada laboratório utilizou condições específicas de processamento das amostras, de amplificação do ácido nucleico e de detecção de amplicons. A análise dos resultados revelou grande diferença de sensibilidade e especificidade entre os laboratórios. Diante disso, os autores concluíram que a técnica de PCR não deve ser utilizada como único método de diagnóstico da tuberculose, e que cuidados especiais devem ser tomados para a interpretação dos resultados, aí se incluindo número apropriado de controles positivos e negativos.

Estudos que utilizaram técnicas moleculares em amostras de biópsias que apresentam granuloma fixadas em formol (HOFMAN et al., 2003; MARCHETTI et al., 1998) apresentaram redução do tempo de diagnóstico e confirmaram casos suspeitos. Assim sendo, a PCR, pode se constituir em um método de alta sensibilidade para a detecção do DNA de *M. tuberculosis* em amostras de tecidos incluídas em blocos parafinados (HSIAO et al., 2003; VAN DER ZANDEN et al., 1998; ZINK; NERLICH, 2004).

Os poucos trabalhos que se debruçaram sobre a detecção do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* POR PCR em amostras de saliva são apresentados a seguir.

Com o objetivo de avaliar o risco de infecção em clínicas dentárias, Eguchi et al. (2003) empreenderam pesquisa na qual utilizaram a técnica Nested PCR para detectar o DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com diagnóstico já confirmado de tuberculose. Para tanto, extraíram o DNA de amostras de saliva, placa dentária, lesões cariosas e placas bacterianas presentes em próteses dentárias. Seguiu-se então a realização da técnica Nested PCR, com a utilização de *primers* específicos para a detecção do *M. tuberculosis*, bem como cultura das amostras para a comparação dos resultados. Os índices de detecção do *M.*

tuberculosis por PCR em amostras de saliva, placa dentária, lesões cariosas e placas bacterianas presentes em próteses dentárias foram, respectivamente: 98,0%, 92,0%, 89,0% e 100%. Já na detecção por cultura, esses índices foram de 17,3%, 2,0%, 0% e 0%. Os autores concluíram que o método de PCR é essencial para a detecção do *M. tuberculosis* em amostras da cavidade bucal. Outro achado importante dessa investigação diz respeito aos resultados obtidos em teste realizado em amostras da cavidade bucal obtidas de 10 pacientes com TB que haviam terminado o tratamento medicamentoso. A detecção do DNA do *M. tuberculosis* em amostras de saliva por Nested PCR foi de 50%. Por outro lado, o método de cultura não detectou a presença de DNA de *M. tuberculosis*.

Lee et al. (2004) estudaram a presença de DNA de *M. tuberculosis* em amostras saliva bucal de 120 pacientes que realizavam tratamento odontológico e desconheciam ter ou terem tido tuberculose. O *Mycobacterium tuberculosis* foi detectado pela PCR em amostras de saliva de 30 dos 120 pacientes estudados (25,0%). De acordo com os autores, além de não ter sido possível determinar se tais pacientes se encontravam no estágio ativo da doença, o elevado percentual de detecção do *M. tuberculosis* pode ser uma decorrência da capacidade de identificação da PCR, que registra tanto as células viáveis quanto as células mortas do micro-organismo.

2.4 MANIFESTAÇÕES BUCAIS DA TUBERCULOSE

As manifestações bucais da tuberculose afetam preferencialmente a língua - ápice, dorso, bordas laterais e base -, mas há relatos de outros sítios acometidos, como: assoalho de boca, lábio, palato mole, úvula, gengiva e mucosa alveolar (HASHIMOTO; TANIOKA, 1989). O acometimento é manifestado sob a forma de úlceras superficiais, lesões endurecidas do tecido mole ou lesões centrais dos maxilares (DIXIT; SHARMA; NUWAL, 2008).

As lesões bucais da tuberculose são usualmente secundárias ao envolvimento pulmonar, e afetam de 0,05 a 0,5% dos pacientes com TB. Lesões bucais primárias da moléstia são raras, e apresentam preferência por pacientes jovens (MIGNONA et al., 2000). Ainda não está claro se tais lesões evoluem da disseminação hematogênica ou por exposição à secreção do catarro contaminado. A descoberta de tuberculose pulmonar ativa a partir de lesões bucais não é comum (NEVILLE et al., 1998).

3 PROPOSIÇÃO

Considerando a exposição realizada na Introdução e na Revisão da Literatura, o presente trabalho teve como objetivos:

- Estabelecer, no laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), técnica de extração de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de esfregaço bucal.
- Avaliar a sensibilidade da PCR para detectar o DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de esfregaço bucal de pacientes com diagnóstico confirmado de tuberculose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa referente ao desenvolvimento do presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob parecer número 37/0-7 (Anexo A).

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram selecionados 80 pacientes, com diagnóstico de tuberculose previamente confirmado por meio de cultura. Foram obtidas 80 amostras de esfregaço bucal desses pacientes, em papel FTA (Whatmann®).

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração de DNA, foi utilizado o método orgânico modificado. A modificação da técnica foi necessária pois a parede do *Mycobacterium* é rica em mucopolissacarídeos, o que lhe confere maior resistência à lise. Para realizar a lise necessária, foi utilizado um período de tempo maior de digestão enzimática pela proteinase K.

Em cada paciente foram utilizadas 5 escovas que, após o esfregaço, eram colocadas em tubos contendo a solução de lise. Posteriormente adicionaram-se 3µl de proteinase K (Invitrogen), e o material foi incubado por 12 horas a 55°C. A solução foi homogeneizada, e a fração proteica foi posteriormente precipitada através da adição de 200µl de solução precipitadora em banho de gelo, por 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm durante minutos, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 600µl de isopropanol 100%. A essa solução adicionou-se 1µl de glicogênio e as amostras foram misturadas por inversão 50 vezes, e posteriormente centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 600µl de etanol 70%. Procedeu-se a nova centrifugação a 13000 rpm durante um minuto. Ao precipitado foram adicionados 50µl de solução de hidratação, e as amostras foram incubadas durante 12 horas em temperatura ambiente. A quantidade de DNA obtido foi mensurada por leitura em espectrofotômetro (Beckmann DU-640), e calculada seguindo a fórmula:

$$\text{DNA} = \frac{\text{OD. 40. diluição}}{1000}$$

O DNA obtido foi armazenado em freezer a -70° C até o momento de sua utilização.

Para precipitação de proteína foi utilizado fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (proporção de 25:24:1),

4.3 PCR

Para a realização da técnica da PCR utilizou-se o protocolo de amplificação por PCR-Nested, descrito por Pierre et al. (1991) para detecção do *M. tuberculosis* em amostras clínicas. Os *primers* utilizados neste trabalho, MT1 e MT2, foram descritos por Eisenach et al. (1990), que amplificaram uma sequência de inserção repetitiva IS6110 do genoma do grupo *M. tuberculosis*.

Para cada reação de amplificação, os seguintes reagentes foram adicionados a um tubo: 5µl do DNA, 20 pmol de cada iniciador, 1,25 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA), 200µM de cada desoxinucleotídeo (Invitrogen), tampão da Taq polimerase e água miliQ autoclavada para completar 50µl. O equipamento utilizado foi o termociclador PTC-100 Peltier-Effect Cycling (MJ Research, Inc). Visando confirmar a qualidade do DNA trabalhado e dos reagentes da reação, realizou-se amplificação do gene constitutivo β -actina para cada reação. Como controle negativo foram utilizados tubos que continham todos os reagentes exceto o DNA, e como controle positivo foi utilizado o DNA extraído da cepa do *M. tuberculosis* (ATCC25177).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2% (Invitrogen), e visualizados em luz ultravioleta (UV) através da marcação pelo brometo de etídio (Invitrogen). Os géis foram documentados fotograficamente com câmera Polaroid, e em seguida digitalizados.

Para confirmar o produto obtido na PCR, seis casos com a banda do tamanho esperado foram sequenciados.

4.4 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos obtidos na PCR foram purificados para sequenciamento. Em um tubo foram adicionados, a cada 5µl de amostra, 2µl da mistura de enzimas para purificação ExoSAP-IT (Amersham). Esse tubo foi acondicionado no termociclador e permaneceu por 1 hora a 37°C, 20 minutos a 80°C e a 4°C até ser retirado. O resultado da purificação, assim como a concentração final de amplicons, foi verificado em gel de agarose e relacionado com as bandas do marcador de peso molecular.

O sequenciamento dos amplicons foi realizado com o auxílio do equipamento MegaBACE 1000®, que é um sistema de análise de DNA com tecnologia de eletroforese capilar (Amersham Biosciences®). As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000®, utilizando o APBiotech DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit.

Em um tubo eppendorf foram adicionados os seguintes reagentes: 8µl de DYEnamic ET Terminator reagent premix, 1µl (5µM) dos iniciadores MT1 e MT2, 4µl (20ng/µl) do produto da PCR, 7µl de água ultra-pura, totalizando 20µl. Esse tubo foi levado ao termociclador com a seguinte ciclagem: 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C.

A purificação pós-reação foi feita por precipitação com acetato de amônio e etanol, adicionando-se aos tubos os seguintes reagentes: 2µl de acetato de amônio 7.5M, e 2,5 volumes de etanol 100% (55µl) para uma concentração final de 70% de etanol.

Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz, e depois centrifugados à temperatura ambiente em microcentrífuga a 13000

rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi removido por aspiração cuidadosa, lavando-se o pellet com 150µl de etanol 70%, e seguiu-se nova centrifugação nas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi removido por aspiração e descartado, e o precipitado seco ao ar. Depois de seco, o precipitado foi ressuspenso em 10µl de Loading Solution, misturado e mantido a 4°C.

Após a colocação do material no sequenciador automático, as sequências foram obtidas pelo Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12®.

5 RESULTADOS

A PCR detectou o DNA do *M. tuberculosis* em amostras de esfregaço bucal de 78 dos 80 pacientes - com diagnóstico de tuberculose previamente confirmado por meio de cultura - selecionados, atingindo um índice de sensibilidade de 97,5% em relação à cultura, considerada padrão-ouro para o diagnóstico de tuberculose. A especificidade da técnica foi de 100%, considerando que a sequência amplificada é homóloga à região do genoma exclusivo dessa bactéria.

Todos os controles positivos provenientes do DNA extraído da cepa do *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177) amplificaram, assim como também foi amplificado, em todas as reações, o gene constitutivo β -actina, o que demonstrou a qualidade do DNA trabalhado e dos componentes da reação. Como era de se esperar, nenhuma amostra controle-negativo foi amplificada, o que evidencia a inexistência de contaminações (Figuras 5.1 a 5.10).



Figura 5.1 – Gel de agarose 2%, amostras 1 a 8



Figura 5.2 – Gel de agarose 2%, amostras 9 a 16



Figura 5.3 – Gel de agarose 2%, amostras 17 a 24



Figura 5.4 – Gel de agarose 2%, amostras 25 a 32



Figura 5.5 – Gel de agarose 2%, amostras 33 a 40



Figura 5.6 – Gel de agarose 2%, amostras 41 a 48



Figura 5.7 – Gel de agarose 2%, amostras 49 a 56



Figura 5.8 – Gel de agarose 2%, amostras 57 a 64



Figura 5.9 – Gel de agarose 2%, amostras 65 a 72



Figura 5.10 – Gel de agarose 2%, amostras 73 a 80

6 DISCUSSÃO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa que se mantém como importante causa de morbimortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento (MUNIZ et al., 2006). Juntamente com China, Índia, Filipinas, Paquistão, Indonésia e Nigéria, o Brasil está entre os 15 países com maior número de casos de tuberculose no mundo, com aproximadamente 85.000 novos casos e 6.000 óbitos por ano. Nesse contexto, o estado de São Paulo responde por quase 20% dos casos de tuberculose do país, cerca de 18.000 notificações e 1.500 óbitos por ano (BRASIL, 2004).

Com o advento da antibioticoterapia, o número de mortes por tuberculose diminuiu gradativamente mas, ainda assim, a doença nunca foi totalmente erradicada de qualquer país. Nos anos 80 – nos quais uma verdadeira epidemia de AIDS se espalhou pelo planeta (muitas pessoas morreram rapidamente, somente por não resistirem às infecções denominadas “oportunistas”), observou-se aumento significativo dos casos de infecções oportunistas, dentre elas a tuberculose. Atualmente, o número notificações de TB em países em desenvolvimento, como o Brasil, atinge níveis alarmantes, o que tem obrigado as autoridades a promoverem campanhas de orientação e conscientização da população para evitar crescimento ainda maior do número de casos.

A tuberculose é uma doença que tem tratamento, portanto o controle do número de indivíduos acometidos depende do diagnóstico rápido dos casos já estabelecidos e da correta utilização dos medicamentos prescritos.

A seguir, as técnicas mais comumente utilizadas para o diagnóstico da tuberculose são discutidas e comparadas entre si e com os resultados deste trabalho.

O diagnóstico da TB pode ser confirmado com a adoção de técnicas já bem estabelecidas na literatura, como a bacteriologia (baciloscopia e cultura), a prova tuberculínica (PPD) e a anatomia patológica. Todas essas provas apresentam algumas desvantagens, que serão comentadas mais adiante e que, de certa forma, prejudicam e/ou atrasam o diagnóstico da doença. Para suprir as necessidades fundamentais para o diagnóstico, como rapidez, especificidade e sensibilidade, as técnicas de biologia molecular, principalmente a técnica de reação em cadeia da polimerase, vêm sendo utilizadas e têm demonstrado excelentes resultados.

A baciloscopia, bastante utilizada em centros de saúde, é uma técnica simples: uma lâmina com amostra de escarro do paciente é preparada, corada pela técnica de Ziehl-Neelsen e avaliada em microscopia. Apesar da simplicidade, a baciloscopia apresenta limitações, dentre as quais se incluem a necessidade de grande número de bacilos para o diagnóstico final positivo, e a incapacidade de diferenciar espécies de micobactérias, o que pode influenciar na especificidade dos resultados. Além disso, há que considerar que o escarro é uma amostra biológica que causa constrangimento tanto ao paciente que a fornece quanto aos profissionais que a coletam e analisam (FERREIRA et al., 2005; LIMA, 2001).

Quando a baciloscopia é comparada à PCR, pode-se notar superioridade desta última - tanto em relação à especificidade quanto em relação à sensibilidade - em todos os tipos de amostras utilizadas (sangue, tecido, escarro e saliva, dentre outros). Os *primers* utilizados na reação de PCR são confeccionados a partir de uma sequência encontrada apenas no DNA do *Mycobacterium tuberculosis*, o que, se os

procedimentos forem corretamente realizados, resguarda a certeza de diagnóstico da TB quando as reações forem amplificadas (AKCAN et al., 1997; CONDOS et al., 1996; EGUCHI et al., 2003; HANCE et al., 1989; HSIAO et al., 2003).

De acordo com os resultados desta investigação, a PCR foi eficiente para a detecção do *M. tuberculosis* em 97,5% (78/80) das amostras de esfregaço bucal coletadas dos 80 pacientes selecionados. De forma semelhante, Ogusku e Salem (2004), Okuda et al. (2003), Querol et al. (1995) e Santos, Kipnis e Kipnis (2007) verificaram sensibilidade de aproximadamente 95% na PCR. Vale lembrar que todos os 80 pacientes que constituíram a amostra investigada neste trabalho já tinham o diagnóstico de TB confirmado pela cultura, justamente para que se pudesse verificar sensibilidade da técnica de PCR em amostras de esfregaço bucal.

A técnica de cultura, considerada padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose, mostra-se mais sensível do que a baciloscopia, pois a positividade do teste pode ser feita com a identificação de menor quantidade de bacilos por mililitro (ml). A sensibilidade da cultura varia de 80 a 100%, e a especificidade de 98 a 100%. O maior fator limitante da cultura é o tempo necessário para o crescimento bacteriano, que varia de 3 a 6 semanas após a inoculação em meios sólidos e líquidos.

O grande ganho, quando se comparam as técnicas de cultura e de PCR, diz respeito ao tempo. Para a detecção do DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, a reação de PCR leva no máximo 6 horas para ser concluída, enquanto no método de cultura, o tempo para o resultado é de no mínimo três semanas. Com a agilidade na conclusão do diagnóstico, os indivíduos acometidos pela TB podem iniciar o tratamento mais rapidamente, o que, além de promover a melhora do quadro clínico do paciente, evita o

contágio de outros indivíduos. A importância do diagnóstico precoce da tuberculose também é destacada por Ferreira et al. (2005).

Além das técnicas descritas acima, biópsias são realizadas para a conclusão do diagnóstico, principalmente em manifestações extrapulmonares da TB, como é o caso das lesões bucais promovidas pela doença. Em muitos casos a anatomia patológica é conclusiva, apresentando características histopatológicas típicas na coloração de rotina de hematoxilina e eosina (HE), e evidenciando os BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen. Porém, em alguns casos, a histopatologia não define o diagnóstico, mesmo com a utilização das colorações específicas. Nessas situações, a técnica de PCR pode ser um método auxiliar importante para a conclusão do diagnóstico, principalmente porque o DNA obtido de material emblocado em parafina mostra-se satisfatório para ser utilizado como amostra para a técnica de PCR (HSIAO et al., 2003; VAN DER ZANDEN et al., 1998; ZINK; NERLICH, 2004).

A necessidade de um teste rápido para o diagnóstico laboratorial da TB levou ao desenvolvimento dos métodos moleculares para a detecção e identificação do *Mycobacterium tuberculosis* diretamente de espécimes clínicos ou a partir das colônias isoladas em cultivo (MELLO; COSTA, 2005).

A detecção do *Mycobacterium tuberculosis* pela PCR tem sido utilizada para diagnóstico da tuberculose pulmonar, pleural e meníngea. Vários procedimentos de PCR têm sido descritos para detectar o genoma do *M. tuberculosis*, visto que as sequências iniciadoras utilizadas podem ser diferentes. A sequência repetitiva IS6110, específica para o complexo *M. tuberculosis* e repetida várias vezes no cromossomo, é a sequência mais utilizada para o diagnóstico e em estudos epidemiológicos (DE WITT et al., 1990; EISENACH et al., 1990).

As reações de PCR realizadas neste estudo foram baseadas em métodos previamente descritos (EGUCHI et al., 2003; EISENACH et al., 1990; PIERRE et al., 1991), e contemplaram a amplificação de um fragmento de 123 pares de base da sequência repetitiva IS6110. Essa sequência foi utilizada porque, como relatado em investigações anteriores (OGUSKU; SALEM, 2004; OKUDA et al., 2003; QUEROL et al., 1995; SANTOS; KIPNIS; KIPNIS,, 2007), possui grande especificidade e sensibilidade. Tal característica foi comprovada no presente trabalho, pelo resultado de 97,5% de amplificação do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de esfregaço bucal.

As amostras clínicas que são utilizadas para a realização da técnica de PCR variam muito de trabalho para trabalho. Essa diversidade de origem das amostras implica não apenas em divergências quanto à padronização das reações de PCR, mas dificulta a comparação de resultados no que diz respeito à sensibilidade e à especificidade das reações. As amostras utilizadas para amplificação do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* constantes da literatura são: sangue, escarro, biópsias, fluido cérebro-espinhal, fluido pleural, fluido de fístula, fezes e pus.

Kox et al. (1994) utilizaram todos os tipos de amostras descritos acima para detectar o DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em casos de tuberculose já confirmados pela técnica de cultura, considerada padrão-ouro para o diagnóstico da moléstia. O DNA de *Mycobacterium tuberculosis* foi amplificado em todas as amostras utilizadas, o que levou os autores a concluírem que a técnica de PCR pode ser utilizada para o diagnóstico da TB em amostras oriundas de diversos sítios.

Neste trabalho foram utilizadas amostras de esfregaço bucal de pacientes com diagnóstico de tuberculose confirmado pela cultura. O fato de não se ter obtido

resultado positivo para o *M. tuberculosis* na PCR das amostras de esfregaço bucal de dois pacientes com cultura positiva para esse organismo sugere que a quantidade de bacilos presentes em tais amostras era inferior à sensibilidade do teste. Esse achado, entretanto, não deve ser considerado uma limitação da PCR na detecção de *Mycobacterium tuberculosis*, e tampouco uma contraindicação ao emprego de amostras de esfregaço bucal para esse procedimento.

Os comentários acima se justificam porque poucos são os relatos existentes na literatura sobre a utilização de amostras de material extraído da cavidade bucal, a extração do DNA do *Mycobacterium tuberculosis* e o diagnóstico da TB, e porque os autores de tais estudos não exploraram adequadamente a possibilidade de fazer, da PCR nesse tipo de material, a técnica padrão para o diagnóstico da tuberculose. Assim sendo, investigações mais aprofundadas e alicerçadas nessa hipótese devem ser realizadas.

Esse é justamente o intuito do presente trabalho: o estabelecimento, no laboratório de Patologia Molecular da disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, da técnica de PCR utilizando amostras de esfregaço bucal para o diagnóstico da TB. Essa técnica oferece todos os requisitos necessários para a realização do diagnóstico da patologia, como rapidez - o resultado pode ficar pronto em aproximadamente 6 horas -, especificidade e sensibilidade.

Além disso, a coleta da amostra de esfregaço bucal é muito bem aceita pelos pacientes, pois é realizada de forma rápida, prática, indolor e não causa constrangimentos.

Nesta investigação, como anteriormente mencionado, a técnica de PCR mostrou-se eficiente em 78 dos 80 casos analisados. Isso prova que o esfregaço bucal

pode se constituir em uma boa amostra, e pode ser mais utilizado em laboratórios para o diagnóstico da TB. Assim sendo, corrobora-se o entendimento de Lima (2001), que acredita que a PCR deve ser disponibilizada em centros de referência para o diagnóstico e o tratamento da tuberculose, não como substituta dos métodos já consagrados, mas como uma ferramenta a mais para o diagnóstico da doença.

7 CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente trabalho, e tendo em vista os resultados obtidos, é possível concluir que a técnica de PCR, cuja sensibilidade na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em 80 das amostras de esfregaço bucal obtidas de pacientes com diagnóstico confirmado de tuberculose foi de 97,5%, é um método auxiliar confiável e importante para o diagnóstico dessa patologia.

REFERÊNCIAS¹

Adam. Medical encyclopedia. PPD skin test. Disponível em: URL: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/9773.htm> [2008a jul. 21].

Adam. Medical encyclopedia. Skin testing PPD. Disponível em: URL: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/images/ency/fullsize/2823.jpg> [2008b jul. 21].

Akcan Y, Tuncer S, Hayran M, Sungur A, Unal S. PCR on disseminated tuberculosis in bone marrow and liver biopsy specimens: correlation to histopathological and clinical diagnosis. *Scand J Infect Dis* 1997;29(3):271-4.

Bammann RH, Fernandez A, Vazquez CMP, Araujo MRE. Broncoscopia no diagnóstico de tuberculose. *Jornal de Pneumologia* 1999;25(4):207-12.

Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 1992;257(5073):1055-64.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pneumologia; 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual do Ministério da Saúde 2000. PNCT - Plano Nacional de Controle da Tuberculose. Normas técnicas, estrutura e operacionalização. Comitê técnico científico de assessoramento à tuberculose. 5ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2000.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância em saúde: dados e indicadores selecionados. DAS/SVS. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. v. 2.

Brett-Major DM, Walsh TE. Laboratory diagnosis of tuberculosis in primary care. *Dis Mon* 2006;52(11-12):450-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviaturas de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Caymmi ALS, Silveira MAS, Montal G, Lemos ACM. Role of the fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of patients with suspected pulmonary. *J Bras Pneumol* 2004;30(1):39-45.

Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using gyrB-restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(7):745-8.

Chin DP, Yajko DM, Hadley WK, Sanders CA, Nassos PS, Madej JJ, et al. Clinical utility of a commercial polymerase chain reaction based test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(6):1872-7.

Collins T. Acute and chronic inflammation. In: Cotran RS, KumarVK, Collins T, editors. *Robbins pathologic basis of disease*. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2005. p. 50–88.

Condos R, McClune A, Rom WN, Schluger NW. Peripheral-bloodbased PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1996;347:1082-5.

De Wit D, Steyn L, Shoemaker S, Sogin M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990;28(11):2437–41.

Dixit R, Sharma S, Nuwal P. Tuberculosis of oral cavity. *Indian J Tuberc* 2008;55(1):51-3.

Eguchi J, Ishihara K, Watanabe A, Fukumoto Y, Okuda K. PCR method is essential for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in oral cavity samples. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(3):156-9.

Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990;161(5):977-81.

Escobedo-Jaimes L, Cicero-Sabido R, Criales-Cortez JL, Ramirez E, Romero M, Rivero V, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of miliary tuberculosis in bone marrow smear. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7(6):580-6.

Ferreira AAA, Queiroz KCS, Torres KP, Ferreira MAF, Accioly H, Alves MSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Rev Bras Epidemiol* 2005;8(2):142-9.

Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362(9398):887-99.

Garcia GF, Correa PCR, Melo MGT, Souza MB. Prevalência da infecção pelo HIV em pacientes internados com tuberculose. *Jornal de Pneumologia* 2000;26(4):189-93.

Grange JM. The global burden of tuberculosis. In: Porter JDH, Grange JM. *Tuberculosis: an interdisciplinary perspective*. London: Imperial College Press; 1999. cap. 1, p. 3-32.

Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol* 1989;3(7):843-9.

Hashimoto Y, Tanioka H. Primary tuberculosis of the tongue: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg* 1989;47(7):744-6.

Hofman V, Selva E, Landraud L, Sicard D, Vénissac N, Castillo L, et al. Value of PCR amplification from formalin-fixed-embedded tissues in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Ann Pathol* 2003;23(3):206-15.

Hsiao PF, Tzen CY, Chen HC, Su HY. Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Int J Dermatol* 2003;42(4):281-6.

Kerr-Pontes LR, Oliveira FA, Freire CA. Tuberculose associada à AIDS: situação da região do nordeste brasileiro. *Rev Saúde Pública* 1997;31(4):323-9.

Kox LFF, Rheinthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1994;32(3):672-8.

Kritski AL, Conde MB, Souza GRM. *Tuberculose: do ambulatório à enfermaria*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 212-28.

Kumar HAK, Gurusurthy P, Ramachandran G, Rajasekaran S, Padmapriyadarsini C, Swaminathan S, et al. Decreased bioavailability of rifampin and other antituberculosis drugs in patients with advanced human immunodeficiency virus disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(11):4473-5.

Kumar R, Gupta N, Sabharwal A, Shalini. Congenital tuberculosis. *Indian J Pediatr* 2005;72(7):631-3.

Leão LEV, Gonçalves JJS. Papel da biópsia pulmonar feita por cirurgia torácica vídeo assistida (CTVA) na investigação de pneumopatias. São Paulo: UNIFESP. Disponível em: URL: http://www.unifesp.br/dcir/torax/Ensino/CTVA/CTVA_DIPD.pdf [2008 jul. 23].

Lee SA, Yoo SY, Kay KS, Kook JK. Detection of hepatitis B virus and *Mycobacterium tuberculosis* in Korean dental patients. J Microbiol 2004;42(3):239-42.

Lima MM, Belluomini M, Almeida MMB, Arantes GR. Co-infecção HIV/tuberculose: necessidade de uma vigilância mais efetiva. Rev Saúde Publica 1997;31(3):217-20.

Lima SSS. Métodos convencionais para o diagnóstico da tuberculose. J Bras Pneumol 2001;34(12):319-31.

Marchetti G, Gori A, Catozzi L, Vago L, Nebuloni M, Rossi MC, et al. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assays. J Clin Microbiol 1998;36(6):1512-7.

Mello FCQ, Costa JF. A utilidade da biologia molecular no diagnóstico da tuberculose. J Bras Pneumol 2005;33(1):188-90.

Mignogna MD, Muzio LLO, Favia G, Ruoppo E, Sammartino G, Zarrelli C, et al. Oral tuberculosis: a clinical evaluation of 42 cases. Oral Dis 2000;6(1):25-30.

Montenegro SH, Gilman RH, Sheen P, Cama R, Caviedes L, Hooper T, et al. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian children by use of a heminested IS6110 polymerase chain reaction assay. Clinical Infectious Diseases 2003;36(1):16-23.

Muniz JN, Ruffino-Netto A, Villa TC, Yamamura M, Arcencio R, Cardozo-Gonzales RI. Epidemiological aspects of human immunodeficiency virus/tuberculosis co-infection in Ribeirão Preto, Brazil from 1998 to 2003. J Bras Pneumol 2006;32(6):529-34.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Infecções bacterianas. In: Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia oral e maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. cap. 5, p. 138-57.

Nogueira LDP. A tuberculose na micro região de Uberaba de 1995 a 2000. [Projeto de Pesquisa] Uberaba: Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2004.

Ogusku MM, Salem JI. Analysis of different primers used in the pCR method: diagnosis of tuberculosis in the state of Amazonas, Brazil. J Bras Pneumol 2004;30(4):433-9.

Okuda T, Akai F, Nakano N, Uchiyama T, Taneda M. A case report of tuberculous meningitis: limits of detection using polymerase chain reaction (PCR) and treatments. No To Shinkei 2003;55(1):65-9.

Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Katoch VM. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res* 2006;124(4):385-98.

Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P, et al. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J Clin Microbiol* 1991;29(4):712-7.

Querol JM, Farga MA, Granda D, Gimeno C, Lomas JG. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 1995;107(6):1631-5.

Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. *J Am Med Assoc* 1995;273(3): 220-6.

Rodrigues CPT, Pinto ER. Tuberculose: riscos associados ao seu tratamento. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2004. Disponível em: URL: www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0304/tuberculose/doc/MYCOBACTERIUMTUBERCULOSIS.html [21 jul. 2008]

Rosseti MLR, Valim ARM, Silva MSN, Rodrigues VS. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Rev Saúde Pública* 2002;36(4):525-32.

Salian NV, Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Bates JH. Polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in histologic specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(4):1150-5.

Santos LC, Kipnis APJ, Kipnis A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Patol Trop* 2007;36(1):1-15.

Schluger NW, Kinney D, Harkin TJ, Rom WN. Clinical utility of the polymerase chain reaction in diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest* 1994;105(4):1116-21.

Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infectious Diseases* 2003;3(10):624-32.

Snider Jr. DE, Roper WL. The new tuberculosis. *N Engl J Med* 1992;326(10):703-5.

Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* 2001;47(5):809-14.

Spada DTA, Santos MAA, Almeida EA, Augusto M, Albarral MIP, Melo FAF. Evaluation of a genetic probe (Gen-Probe Accuprobe ® system) in comparison to traditional methods for identifying members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bras Pneumol* 2005;31(3): 219-24.

Suffys PN, Palomino JC, Cardoso Leão SC, Espitia C, Cataldi A, Alito A, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4(2):179-83.

Tambe Y. Ziehl Neelsen stain. Disponível em: URL: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ziehl_Neelsen_stain.jpg [2008 mar. 28].

van der Zanden AG, Hoentgen AH, Heilmann FG, Weltvreden EF, Schouls LM, van Embden JD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Mol Pathol* 1998;51(4):209–14.

WHO. Global tuberculosis control. surveillance, planning, financing: WHO report 2004. Geneva: WHO; 2004. Disponível em: URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2005/en/ [2008 ago. 12].

Zink AR, Nerlich AG. Molecular strain identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in archival tissue samples. *J Clin Pathol* 2004;57(11):1185-92.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



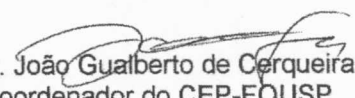
Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
37/07

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "**AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO DNA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DE AMOSTRAS DE SALIVA**", de responsabilidade dos(a) Pesquisadores(a) Vanessa Rosália Remualdo orientação do Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 11 de dezembro de 2008.


Prof. Dr. João Guarberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP