

SUELI MASSUMI NAKATANI

**DETECÇÃO MOLECULAR DO *Mycobacterium avium*
E *Mycobacterium tuberculosis* EM AMOSTRAS DE
SANGUE DE PACIENTES COM SÍNDROME DA
IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Patologia, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Iara J. T. Messias - Reason

Co-orientadora:

Prof.^a Dr.^a Marion Burger

CURITIBA

2002

Nakatani, Sueli Massumi

Detecção molecular do *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue de pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida / Sueli Massumi Nakatani. - Curitiba, 2002.

xix,96 p., il. 28cm.

Dissertação – (Mestrado) – Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora : Profa. Dra. Iara J. T. Messias-Reason. Co-orientadora: Profa. Dra. Marion Burger

**1. Micobactérias. 2. Síndrome de imunodeficiência adquirida.
I. Título.**

Título: Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de Análises Clínicas.

Dissertação: "Detecção molecular do *Mycobacterium avium* e do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue de pacientes com AIDS".

Candidata: Sueli Massumi Nakatani

**Banca Examinadora: Profª. Dra. Iara José Messias (Orientadora/Presidente)
Prof. Dr. Celso Luis Cardoso (Titular/UEM)
Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo (Titular/UFPR)**

Parecer: A Comissão Examinadora reunida nesta data, nas dependências do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, após exame e julgamento da dissertação, atribui as seguintes notas: Profª. Dra. Iara José Messias: Nota: 10,0; Prof. Dr. Celso Luis Cardoso: Nota: 10,0; Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo: Nota: 10,0; é de parecer que constitui um trabalho científico e recomenda a sua publicação após as correções sugeridas.

**APROVA A DISSERTAÇÃO COM A NOTA:10,0.....e
CONCEITOA.....com LOUVOR!**

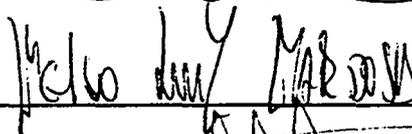
A candidata tem 60 (sessenta) dias para as correções propostas pela Comissão, para que se possa dar continuidade ao processo.

Curitiba, 26 de julho de 2002

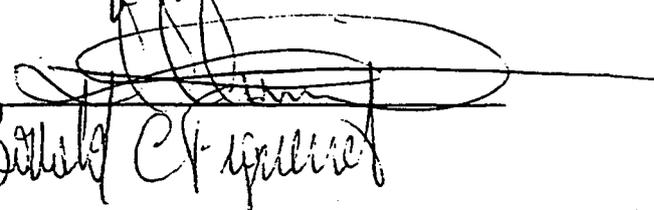
Profª. Dra. Iara José Messias



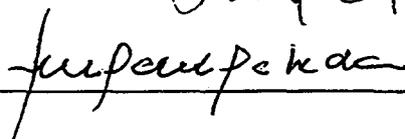
Prof. Dr. Celso Luis Cardoso



Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo



Ciente candidata:



DEDICATÓRIA

Às minhas filhas

Viviane, Lidiane e Cristiane

por terem me dado a benção da maternidade
e o sentido do amor mais profundo.

Ao Tomi, esposo e companheiro

por todos os momentos de alegria
compartilhados juntos, ao longo de todos
esses anos.

Aos meus pais

Kayoko("in memorian") e Toru,
pelo exemplo de vida.

Ó SENHOR DEUS,

eu te agradeço de todo o coração;

Quando te chamei, tu me respondeste

e, com o teu poder, aumentaste as

minhas forças.

(Salmos 138, v.1,3)

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, e que tenho certeza, sem a colaboração de cada uma delas não teria chegado ao bom termo, o meu mais profundo agradecimento , em especial:

À Professora, Dra. IARA J.T. MESSIAS-REASON do Departamento de Patologia Médica da UFPR, orientadora deste trabalho, por seu estímulo, apoio e que com o seu conhecimento acadêmico norteou todos os passos do trabalho, o meu sincero respeito e admiração.

À Professora Dra MARION BURGER, do Departamento de Pediatria do Hospital de Clínica da UFPR, que foi a fonte de inspiração e que desde o início me incentivou e me direcionou em todas as etapas desse trabalho com seus conhecimentos e experiência, o meu Muito Obrigado.

A todos os médicos infectologistas que com sua dedicação e experiência profissional possibilitaram a triagem dos pacientes, a minha sincera gratidão em especial a: Dra. Miriam Matsuno Carvalho, Dra. Maria Cristina Assef, Dra Maria das Graças Sasaki, Dr. Alceu Pacheco, Dr. Clóvis Arns da Cunha, Dr. Tony Tahan, Dra. Neiva Raboni Magni, Dra. Denise Kopp, Dra Rosana Machado, Dr. Luiz Corayola, Dr. Jaime Luiz L. da Rocha, Dr. Gerson B. da Silva.

Um agradecimento especial pelo apoio irrestrito, amizade e carinho à equipe da Seção de Biologia Molecular do Laboratório Central do Estado, minhas amigas Claudia Zen, Deborah Bubba e Helena Misugi.

A todos os pacientes que participaram desta pesquisa a minha gratidão.

À direção do Laboratório Central do Estado, em particular a Dra. Ana Luíza Borges, Márcia Regina Graças Torres, e Marise do Carmo Machado que através dos seus incentivos possibilitou-me realizar todo o trabalho prático.

À equipe da Seção de Bacteriologia do Laboratório Central do Estado, especialmente à Sonia Regina Brockelt, Farmacêutica-Bioquímica, responsável pelo Serviço de Diagnóstico da Tuberculose, pela sua inestimável colaboração na identificação bioquímica das micobactérias. A todos os demais colegas e também aos técnicos César Zambão, Nelson Andruzinski, Valéria V. Gomes Pereira.

À toda equipe do Laboratório de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR, em especial à Dra. Helena H. de Mello, Dra. Libera Maria Dalla Costa, Dra. Laura Lúcia Cogo, pela permissão na incubação da hemoculturas e contribuição nas várias etapas do meu trabalho, meu sincero agradecimento.

A Soraia Reda Gilber, Ana Maria B. Bortolotto e Oscar Lago Pessoa da Seção de Imunologia do Laboratório Central do Estado, pela triagem das amostras, que demonstraram um espírito de cooperação e boa vontade sempre que necessitei, a minha sincera estima.

Ao Professor Doutor Aguinaldo José Nascimento pelo apoio, amizade e análises estatísticas.

À Professora Dra Cinthia Pichet, pela amizade, correções e sugestões.

A Gislene Botão do Setor de Microbiologia do Laboratório do Hospital Nossa Sra. das Graças pela contribuição.

A Organon Teknika pelos frascos de Hemocultura MB/BacT gentilmente cedidos para a realização deste trabalho.

A Roche do Brasil, especialmente a Evelize Cobo pela doação de Kits.

A Carlos Santos, acessor científico da Visible Genetics (G/V) São Paulo, que com sua experiência muitas vezes norteou a direção deste trabalho.

Ao Professor Dr. Paulo Wunder, que esteve presente no início deste trabalho e que gentilmente cedeu o empréstimo do termociclador, para a realização do trabalho.

Ao Farmacêutico Bioquímico Armando Nabarro, responsável pelo Laboratório do Hospital do Trabalhador e à técnica Janaína Tozini de Paula, pela colaboração na coleta de sangue.

À equipe da Seção de Imunologia do Laboratório do Hospital de Clínica da UFPR, especialmente à Miriam Beltrame pelo acesso aos dados.

À equipe de enfermagem do Hospital Oswaldo Cruz em especial a enfermeira chefe Clóris Aparecida Kriger pela colaboração sempre que necessitei na coleta do sangue.

À equipe da Seção de Imunologia do Laboratório da Prefeitura Municipal de Curitiba, pela contribuição das amostras, em especial a técnica Sara Ferraz Vianti.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em especial ao Professor Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pela sua batalha incessante pelo crescimento da nossa Pós Graduação.

Às Professoras Dras. Mayumi Elisa Sato, Maria Suely Leonart, Almeriane Santos, da Coordenação da Pós Graduação De Ciências Farmacêuticas, pelo incentivo sempre presente.

À minha amiga Patrícia R.Reiss pelas ilustrações desse trabalho.

A todos os colegas do LACEN, que sempre me incentivaram com palavras de apoio, incentivo e amizade.

Às minhas colegas de Pós Graduação, pelos momentos vividos juntos e o apoio no dia a dia.

E a todas as pessoas que não citei mas que estão presentes em minha vida, e faz com que ela seja feita de amizades, carinho e alegrias.

OUVE A EXORTAÇÃO DA AURORA
CUIDA DESTE DIA
POIS É A VIDA, A PRÓPRIA VIDA DA VIDA.
EM SEU BREVE CURSO RESIDEM TODAS
AS VERDADES E A REALIDADE DA TUA EXISTÊNCIA,
A BENÇÃO DO CRESCIMENTO,
A GLÓRIA DA AÇÃO,
O ESPLENDOR DA BELEZA,
POIS ONTEM É APENAS UM SONHO,
E AMANHÃ, APENAS UMA VISÃO,
MAS HOJE BEM VIVIDO TORNA
CADA ONTEM UM SONHO DE FELICIDADE
E CADA AMANHÃ UMA VISÃO DE ESPERANÇA.
CUIDA BEM, POIS, DESTE DIA.

(REGISTRO VEDA SANSKRITO-500.A C)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA.....	3
2.1.1 Características moleculares e biológicas do HIV	3
2.1.2 Epidemiologia.....	4
2.1.3 Estrutura e genes do HIV	4
2.1.4 Ciclo de infecção do vírus	6
2.1.5 Imunologia da infecção pelo HIV.....	9
2.1.6 Curso da infecção pelo HIV.....	10
2.2 MICOBACTÉRIAS	12
2.2.1 Classificação	12
2.2.2 Características gerais das micobactérias.....	13
2.2.3 Epidemiologia da infecção causada por <i>M. avium</i> em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	14
2.2.4 Patogênese e sintomatologia clínica da infecção pelo <i>M. avium</i> em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	16

2.2.5 Epidemiologia da infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> em pacientes HIV positivos	18
2.2.6 Patogênese e sintomatologia clínica da infecção pelo <i>M.tuberculosis</i> em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	20
2.2.7 Co-infecção HIV-Micobactérias.....	21
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOBACTÉRIAS.....	24
2.3.1 Baciloscopia	24
2.3.2 Cultura.....	25
2.3.3 Identificação bioquímica.....	27
2.3.4 Métodos alternativos para identificação de micobactérias.....	27
2.3.4.1 Sistemas automatizados de monitoramento contínuo.....	27
2.3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28
2.3.4.3 Uso da PCR na identificação de micobactérias	31
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	33
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
4.1 PACIENTES	35
4.2 AMOSTRAS DE SANGUE	36
4.3 CONTAGEM DE LINFÓCITOS TCD4+	36
4.4 CULTURA, BACILOSCOPIA, SUBCULTIVO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICOBACTÉRIAS.....	37
4.5 EXTRAÇÃO DO DNA.....	41
4.6 LEITURA DAS CONCENTRAÇÕES DE DNA.....	45
4.7 PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DA PCR.....	44
4.7.1 PCR do sangue periférico	46
4.7.2 PCR do frasco de hemocultura	46
4.7.3 Amplificação da Região IS 1245 para detecção do <i>M. avium</i> (Protocolo de HAAS).....	47

4.7.4 Amplificação da Região 16S rRNA para detecção de <i>M. avium</i>	47
4.7.5 Amplificação da Região 16S rRNA para pesquisa de <i>Mycobacterium sp</i>	48
4.7.6 Amplificação da Região IS 6110 para detecção de <i>M. tuberculosis</i>	48
4.7.7 Detecção do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pelo Kit AMPLICOR (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> – MTB – Test Roche)	49
4.7.8 Amplificação do gene da β -globina	50
4.8 DETECÇÃO E ANÁLISE DO PRODUTO DA PCR	51
5 RESULTADOS	52
5.1 HEMOCULTURAS	52
5.2 CONTAGEM DE LINFÓCITOS TCD4+	53
5.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE HEMOCULTURAS MB/BACT	54
5.4 LEITURA DAS CONCENTRAÇÕES DE DNA	58
5.5 PCR DAS AMOSTRAS DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA MB/BACT	58
5.6 PCR PARA <i>M. avium</i> DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO	62
5.7 PCR PARA <i>M. tuberculosis</i> DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO	62
5.8 PCR PARA β -GLOBINA	65
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXOS	92

LISTA DE TABELAS

1	PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR MICOBACTÉRIAS EM PACIENTES HIV POSITIVOS EM DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS	19
2	PCR REALIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.....	46
3	TEMPO DE DETECÇÃO (EM DIAS) DAS HEMOCULTURAS POSITIVAS PARA <i>M. avium</i> E <i>M. tuberculosis</i> ATRAVÉS DO SISTEMA BacT/Alert	52
4	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM MICOBACTERIEMIA QUANTO À IDADE, SEXO, CONTAGEM DE LINFÓCITOS TCD4+ E MICOBACTÉRIA IDENTIFICADA.....	54
5	TAXA DE ACURÁCIA DA PCR PARA DETECÇÃO DE <i>M. tuberculosis</i> E <i>M. avium</i> DE FRASCOS DE HEMOCULTURA E SANGUE PERIFÉRICO EM RELAÇÃO AO ISOLAMENTO EM CULTURA	59
6	SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, PREVALÊNCIA E TAXA DE ERRO FALSO POSITIVO E FALSO NEGATIVO DA PCR PARA <i>M. tuberculosis</i> E <i>M. avium</i> DE FRASCOS DE HEMOCULTURA E SANGUE PERIFÉRICO EM RELAÇÃO AO ISOLAMENTO EM CULTURA.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

- 1 FREQUÊNCIA (%) DE PACIENTES COM SIDA E SUSPEITA DE MICOBACTERIEMIA EM RELAÇÃO À IDADE..... 36
- 2 FREQUÊNCIA DE PACIENTES COM SIDA E SUSPEITA DE MICOBACTERIEMIA EM RELAÇÃO À CONTAGEM DOS LINFÓCITOS CD4+ 53

LISTA DE FIGURAS

1 ESTRUTURA DO HIV	5
2 CICLO DA REPLICAÇÃO DO HIV	6
3 SEQUÊNCIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE AS MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS TCD4+ E O HIV	8
4 CURSO DA INFECÇÃO DO HIV	11
5 PRESENÇA DE <i>M. avium</i> DENTRO DOS MACRÓFAGOS – COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN	13
6 COLÔNIAS DE <i>M. avium</i> EM MEIO SÓLIDO DE LÖWESTEIN-JENSEN	26
7 COLÔNIAS DE <i>M. tuberculosis</i> EM MEIO SÓLIDO DE LÖWESTEIN-JENSEN.....	26
8 MODELO ESQUEMÁTICO DAS ETAPA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	29
9 FLUXOGRAMA DA COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	39
10 IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS ATRAVÉS DE TESTES BIOQUÍMICOS.....	40
11 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO UTILIZANDO O KIT <i>GENOMIC-PREP DNA ISOLATION</i> (MÉTODO I)	43
12 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS DE HEMOCULTURA UTILIZANDO O MÉTODO DE BOOM MODIFICADO (MÉTODO III).....	44
13 PCR PARA <i>M. avium</i> DE HEMOCULTURA (MB/BACT) POSITIVA COMPARANDO OS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA.....	56
14 PCR PARA <i>M. avium</i> DE HEMOCULTURAS (MB/BACT) POSITIVAS UTILIZANDO O MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA DESCRITO POR BOOM.....	56
15 PCR PARA <i>M. avium</i> DE HEMOCULTURAS (MB/BACT) POSITIVAS UTILIZANDO OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BOOM E BOOM MODIFICADO (TAMPÃO DE LISE R).....	57
16 PCR PARA <i>M. avium</i> DE HEMOCULTURAS (MB/BACT) POSITIVAS UTILIZANDO OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BOOM E BOOM MODIFICADO (TAMPÃO DE LISE O)	57
17 PCR PARA <i>M. avium</i> E <i>M. tuberculosis</i> DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)	60
18 PCR PARA <i>M. avium</i> E <i>M. tuberculosis</i> DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)	60
19 PCR PARA <i>M. avium</i> E <i>M.tuberculosis</i> DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)	61
20 PCR PARA <i>M. avium</i> E <i>M.tuberculosis</i> DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)	61
21 PCR PARA <i>M. avium</i> DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA MB/BACT (h) E SANGUE PERIFÉRICO (sp)	63
22 PCR PARA <i>M. avium</i> DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA MB/BACT (h) E DO SANGUE PERIFÉRICO (sp)	63
23 PCR PARA <i>M. tuberculosis</i> DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA MB/BACT (h) E SANGUE PERIFÉRICO (sp)	64

24 PCR PARA <i>M. tuberculosis</i> DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA MB/BACT (h) E SANGUE PERIFÉRICO (sp)	64
25 RESULTADO DA PCR PARA <i>M. tuberculosis</i> DAS AMOSTRAS DO SANGUE PERIFÉRICO, QUE TIVERAM HEMOCULTURA POSITIVA, UTILIZANDO O KIT AMPLICOR MTB – ROCHE- DETECÇÃO POR ELISA	65
26 PCR PARA β -GLOBINA DO SANGUE PERIFÉRICO	67
27 PCR PARA β -GLOBINA DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA MB/BACT	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µm	Micra
≥	Maior igual
β	Beta
µg	Microgramas
µl	Microlitro
A	Adenina
Å	Angstrom
C	Citosina
Ca ⁺⁺	Cálcio
CCR5	Receptor de Quimiocinas
CD4	Marcador de Membrana de Linfócitos T auxiliares
cels	Células
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus da Leucemia Humana de célula T
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleucina
IS	Seqüência de Inserção
Kb	Kilobase
min.	Minutos
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

pH	Potencial Hidrogeniônico
pM	Pico mol
RLU	Unidades Relativa de luminescência
RNA	Ácido Ribonucléico
s	Segundos
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SPS	Polianetol Sulfoneto de Sódio
T	Timina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPR	Universidade Federal do Paraná
V/V	Volume- Volume

RESUMO

Neste estudo avaliou-se a prevalência da infecção disseminada por *M. avium* e *M. tuberculosis* em 80 pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, linfócitos T CD4⁺ ≤ 100cels/μl e suspeita clínica de infecção por micobactérias. Testou-se a sensibilidade e a especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar micobactérias diretamente do sangue periférico quando comparados com os resultados obtidos da hemocultura. Foram realizadas também PCR para identificação das espécies de micobactérias diretamente dos frascos de hemoculturas. Para aumentar a eficácia desta identificação foi necessário aprimorar um método de extração e purificação do DNA das hemoculturas que possibilitou a eliminação de inibidores da reação de amplificação como o polianetol sulfonato de sódio (SPS) e componentes da heme presentes nos frascos de hemocultura. O método desenvolvido promoveu o aumento da sensibilidade da PCR, permitindo a identificação de micobactérias em 100% dos frascos de hemoculturas positivas. Entre os 80 pacientes analisados, 12 (15%) apresentaram hemoculturas positivas para micobactérias, sendo 7 (8,8%) positivas para *M. avium* e 5 (6,2%) positivas para *M. tuberculosis*. A PCR realizada diretamente das amostras de sangue periférico foi positiva para *M. avium* em 3/7 amostras, e negativa para *M. tuberculosis*. A sensibilidade e a especificidade da PCR do sangue periférico para detecção do *M. avium* quando comparadas com cultura em Löwenstein-Jensen foi de 42,9 e 100%, respectivamente. Estes resultados demonstram que a hemocultura é um método mais sensível do que a PCR quando realizada diretamente de amostras de sangue periférico para detecção das micobactérias, porém a PCR permitiu a identificação precoce das espécies de micobactérias dos frascos de hemoculturas. Nos métodos tradicionais a identificação das espécies de micobactérias a partir dos frascos de hemocultura leva em torno de 40 dias, no presente trabalho levou-se em média 3 dias para esta identificação, com um ganho de 37 dias. Pelo fato de que a escolha da terapia, assim como outros cuidados clínicos são dependentes da espécie da micobactéria isolada, a identificação precoce destas espécies através da PCR pode contribuir para um melhor manejo destes pacientes.

ABSTRACT

In this study we evaluated the prevalence of disseminated mycobacterial disease caused by *M. avium* and *M. tuberculosis* in eighty AIDS patients with clinical symptoms and CD4 cells ≤ 100 cells/ μ l. We tested the sensitivity and specificity of Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect mycobacteria directly from peripheral blood, when compared with blood culture results as the gold standard. For optimization of PCR detection from blood culture, an efficient DNA extraction method was developed to eliminate the presence of inhibitory substances such as heme compounds and sodium polyanethossulfonate (SPS). A total of 12/80 (15%) patients were positive for mycobacteria in blood culture: seven (8,8%) patients had positive blood culture for *M. avium* and five (6,2%) for *M. tuberculosis*. Only 3/12 of the patients with positive blood culture had a positive PCR in the peripheral blood for *Mycobacterium avium*. None of 5 patients with positive blood culture for *M. tuberculosis* had a positive PCR in the peripheral blood. The sensitivity and specificity of the PCR method for detection of *M. avium* in peripheral blood when compared to the results of Löwenstein-Jensen cultures were 42,8% and 100%, respectively. The identification of mycobacteria species using classical methods requires about 40 days. In the present study, the identification of mycobacteria from blood culture fluid by PCR took about 3 days, with an improvement of 37 days in the detection time. These results suggest that blood culture is more sensitive than PCR to detect bacteremia in the peripheral blood, but PCR has improved the turnaround time identification of mycobacterial species from blood cultures fluids. Since the choice of therapy and other medical care are dependent on isolated mycobacteria, an early species identification by PCR might improve the management of these patients.

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) causada pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), foi primeiramente descrita na década de 80, caracterizada pela imunossupressão e diferentes manifestações clínicas, entre as quais incluem-se: os processos malignos, a perda da massa muscular, a degeneração do sistema nervoso e principalmente as infecções oportunistas, que são muitas vezes de difícil diagnóstico pelos métodos laboratoriais clássicos (ABBAS,1999).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Programa para HIV/AIDS da Organização das Nações Unidas, calcula-se que 34,3 milhões de pessoas no mundo estejam contaminados pelo HIV (estimativa feita no final de 1999) e que a cada dia, 15.000 novas pessoas são infectadas (GAYLE, 2001). No Brasil, há 540 mil pessoas infectadas pelo HIV (DETONI, 2001).

O grau de morbidade e de mortalidade causado pelo HIV e o impacto global da infecção sobre os recursos da saúde pública e da economia são enormes e continuam em estágio crescente de evolução.

As micobactérias são consideradas como importantes patógenos responsáveis pelas infecções oportunistas nos pacientes com SIDA. Diferentes estudos têm sugerido que o *Mycobacterium tuberculosis* e o *Mycobacterium avium* representam cerca de 80% das micobactérias isoladas de pacientes aidéticos (SION et al.,1999). Apesar da infecção por *M.avium* ser detectada em 50% das necrópsias de pacientes com SIDA (NIGHTINGALE, 1992), sua identificação "in vivo" nestes pacientes com SIDA está em torno de 3%, sugerindo que a maioria das infecções por *M. avium* não está sendo detectada (WALLACE, 1998). O diagnóstico da bacteriemia por *M. avium* é realizado freqüentemente por sinais e sintomas sugestivos como febre, perda de peso, linfadenopatia.

Tem sido demonstrado que somente 12% dos pacientes suspeitos de infecção por *M. avium* têm culturas de sangue positivas. Considerando que a identificação de micobactérias, a partir de hemoculturas, leva em torno de quatro semanas após a inoculação, existe necessidade de desenvolver técnicas mais rápidas na identificação de micobactérias (MCGREGOR, 1999).

Em contraste com a extensa bibliografia sobre a bacteriemia por *M. avium* em *pacientes com o HIV*, a bacteriemia causada por *M. tuberculosis* é raramente descrita (CLARK,1991). Mais recentemente, a bacteriemia por *M. tuberculosis* demonstrou ser relativamente freqüente em pacientes infectados com o HIV (MONTESSORI,1996).

As técnicas de biologia molecular, ou seja, a análise e caracterização do material genético, representam um recurso extremamente importante no diagnóstico laboratorial rápido e eficaz de uma série de patologias, sobretudo nas doenças infecciosas e genéticas. Desde a sua descrição em 1985, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma das técnicas mais difundidas para o diagnóstico precoce das infecções oportunistas em pacientes imunodeprimidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA.

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foi primeiramente descrita na década de 80, caracterizada por imunossupressão com diversas manifestações clínicas, incluindo infecções oportunistas, processos malignos, perda de massa muscular e degeneração do sistema nervoso central. A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida é causada por um retrovírus, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), descrito por MONTAGNIER, et al. (1984), como um novo tipo de retrovírus, semelhante aos vírus linfotrópicos humanos HTLV-I e HTLV-II, mas com características morfológicas, biológicas e imunológicas próprias. Foi denominado como HTLV-III pela equipe de pesquisa americana (GALLO, 1984) e LAV (vírus associado à linfadenopatia) pelo grupo de pesquisa francês, liderado pelo pesquisador Montagnier. Posteriormente, uniformizou-se a nomenclatura internacional denominando-o como HIV, isto é, vírus da imunodeficiência humana (LEVY, et al., 1984).

2.1.1 Características moleculares e biológicas do HIV

Os vírus HIV são membros do gênero *Lentivirinae* da família *Retroviridae*. A variabilidade do HIV deve-se à sua alta taxa de mutações e recombinações, ocorrendo uma grande variação da distribuição geográfica dos diferentes grupos e subtipos. Até o momento foram identificados dois tipos relacionados de HIV, designados HIV-1 e HIV-2. Esses dois tipos diferem quanto à estrutura genômica e antigenicidade, apresentando apenas 40% de homologia na seqüência de ácidos nucléicos. O HIV-2 é endêmico na África Ocidental e menos virulento que o HIV-1

(CLAVEL, 1998). O HIV-1 é classificado em três grupos: M, O e N. O grupo M do HIV-1 é dividido em 10 subtipos (de A até J). Para o HIV-2 foram descritos 5 subtipos (de A até E) (SCHÜPBACH e GALLO, 2000).

2.1.2 Epidemiologia

As infecções pelo HIV já existiam na África Central há várias décadas onde a prevalência entre homens e mulheres era igual. No entanto, o primeiro relato de SIDA ocorreu no Estados Unidos em junho de 1981, inicialmente prevalente em homossexuais e pacientes com hemofilia (SCHÜPBACH e GALLO, 2000).

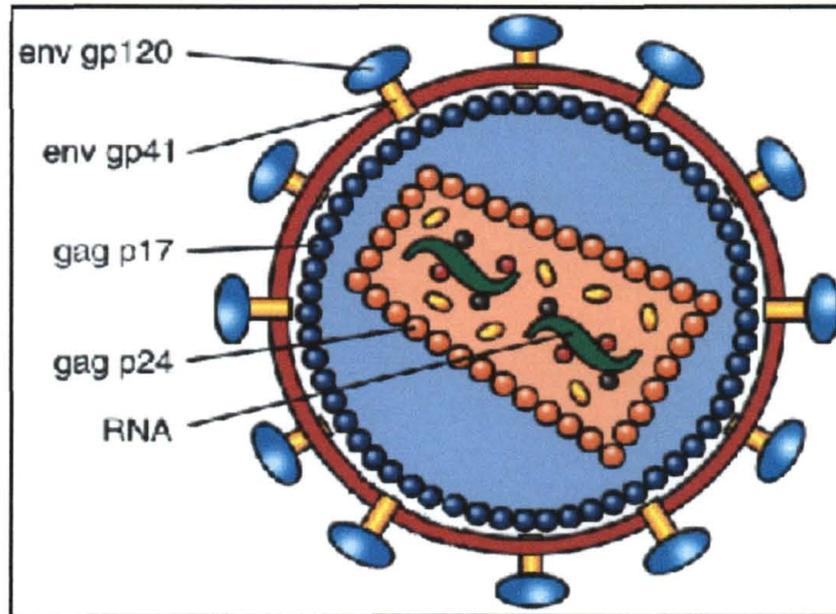
Atualmente sabe-se que a transmissão do HIV ocorre através do contato com fluidos corporais infectados, tais como: sangue, sêmen, secreções vaginais e leite materno. Sendo estes fluidos mais efetivos na transmissão do HIV do que os fluídos corporais que apresentam baixa celularidade como: saliva, lágrima e urina. A transmissão ocorre através da mucosa ou da pele lesada, quer durante a relação sexual (heterossexual ou homossexual), ou através da inoculação de sangue contaminado no uso de drogas intravenosas, transfusão sanguínea ou acidente perfuro-cortante (SCHWARTZ, 1999).

A transmissão materno-fetal do HIV é estimada em 15 a 35% e pode ocorrer intra-útero, intra-parto, ou pós-parto (aleitamento materno). Múltiplos fatores influenciam a transmissão vertical do HIV, tais como: gestante com alta carga viral, baixo número de linfócitos CD4⁺ (diminuição da imunidade mediada por células), ruptura prematura das membranas amnióticas, parto prematuro, recém nato de baixo peso, co-infecções principalmente devido a doenças sexualmente transmissíveis não tratadas e trabalho de parto prolongado (GAYLE, 2001).

2.1.3 Estrutura e genes do HIV

O HIV-1 tem um diâmetro de aproximadamente 1,000 Å. O genoma consiste em 2 fitas simples idênticas não complementares, de ácido ribonucléico (RNA), cada uma com aproximadamente 9,2 kb, localizada dentro de um capsídeo protéico, circundado por um envelope lipoprotéico (Figura 1).

FIGURA 1: ESTRUTURA DO HIV



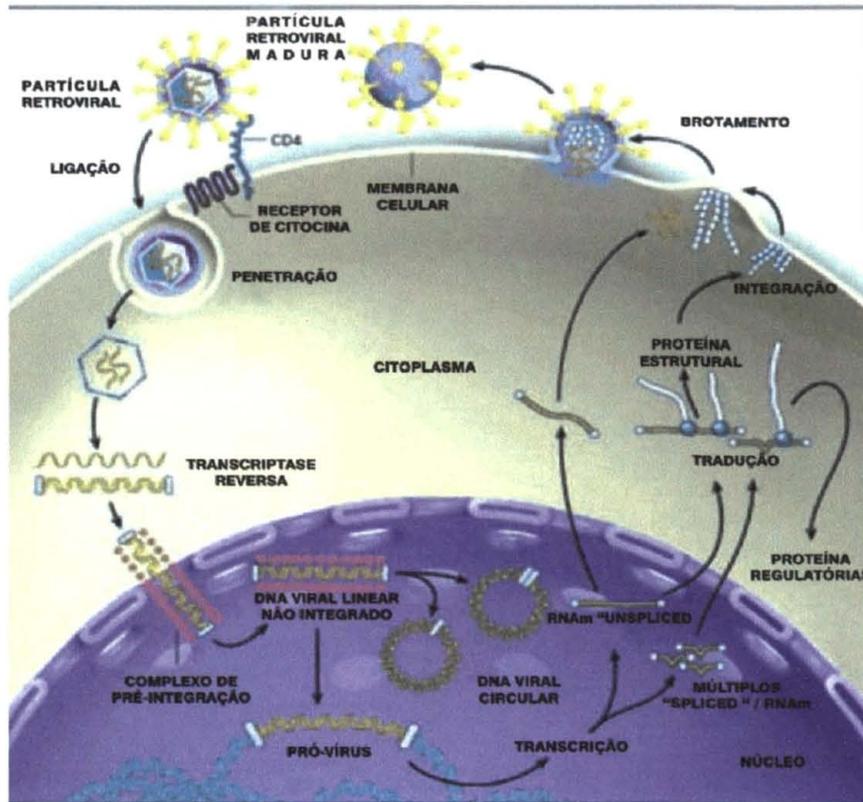
FONTE: www.media.clarkson.Edu/health_topica/aíses12/page3.htm

Todos os retrovírus, inclusive o HIV-1, possuem três genes principais: *gag*, *pol*, e *env*. O gene *gag* (grupo antígeno específico) é o gene que codifica as proteínas estruturais do core, enquanto que o gene *env* (envelope) codifica o precursor da glicoproteína do envelope viral, *gp* 160. Esta é clivada em *gp*120 e *gp* 41, que são duas glicoproteínas importantes na ligação do vírus com os linfócitos $CD4^+$. O gene *pol* (polimerase) codifica várias enzimas: protease, integrase, ribonuclease, incluindo a transcriptase reversa (RT), as quais estão envolvidas na integração e na replicação viral. As demais proteínas são codificadas por outros seis genes: *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, e *nef*, importantes na replicação viral (SCHWARTZ e NAIR, 1999).

As partículas do HIV contêm a enzima transcriptase reversa (RT) que é clivada e ativada por um precursor da protease viral (PR). A enzima RT tem três distintas funções enzimáticas: atua como DNA polimerase RNA dependente, atividade de RnaseH e DNA polimerase DNA dependente. Após a infecção da célula hospedeira, as diferentes funções da RT começam a agir, primeiramente sintetizando o cDNA a partir da fita de RNA. Então a Rnase H degrada o RNA do

híbrido cDNA-RNA e em seguida duplica a fita de cDNA. A fita dupla de DNA ainda associada com alguma proteína viral no complexo da pré-integração, migra para dentro do núcleo onde é integrada ao genoma do hospedeiro por uma enzima retroviral específica, a integrase. O retrovírus integrado ao genoma do hospedeiro é denominado de pró-vírus (SCHÜPBACH e GALLO, 2000).

FIGURA 2 - CICLO DA REPLICAÇÃO DO HIV



FONTE: FURTADO, 1999

2.1.4 Ciclo de infecção do HIV

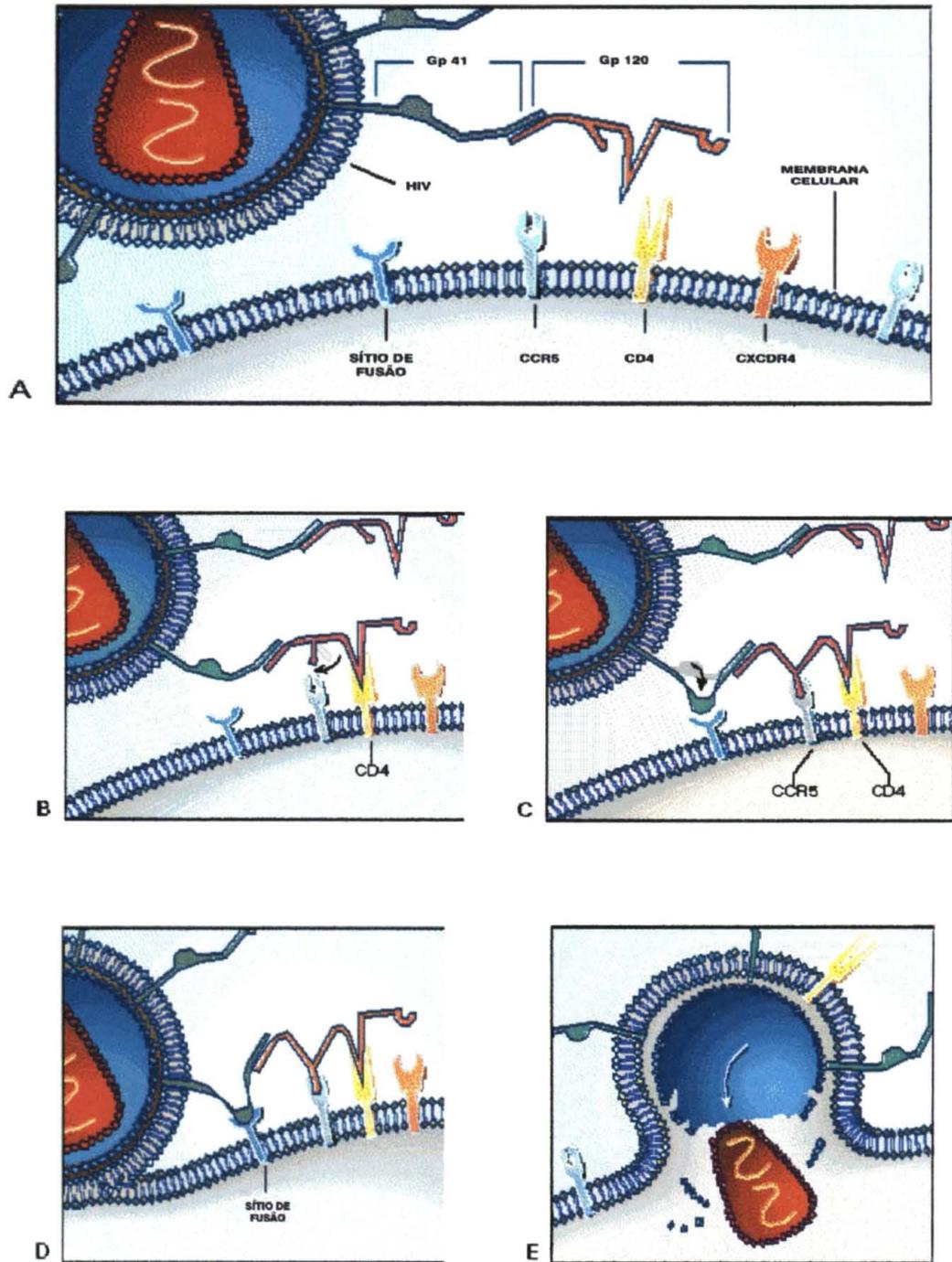
As moléculas CD4 são expressas primariamente nos linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e outras células apresentadoras de antígenos. O HIV penetra na célula pela ligação da glicoproteína 120 (gp120) ao receptor CD4 da célula hospedeira levando a uma mudança conformacional e interação do complexo

CD4 e gp 120 com receptores de quimiocinas (ALKHATIB, 1996; DENG, 1996; FENG, 1996).

Em seguida, a glicoproteína 41 (gp 41) se insere dentro da membrana da célula hospedeira, levando a fusão das membranas celular hospedeira e viral (Figura 3). Participam dessas ligações co-receptores que se ligam a quimiocinas, as quais estão envolvidas no controle da ativação e migração de vários leucócitos aos sítios de infecção. As células de Langerhans ou monócitos/ macrófagos expressam o receptor CCR5 de quimiocinas que permitem a infecção por cepas com tropismo por monócitos (*M. Tropic*). Estas cepas se replicam em monócitos, mas não em células de linhagem T ativadas, presentes no início da infecção (FAUCI, 1996). Esta interação é inibida pelos ligantes do CCR5 as β -quimiocinas RANTES, MIP-1 α , receptor MIP-1 β , descritas como fatores de supressão para o HIV (ALKAHATIB, 1996). O co-receptor para os linfócitos T CD4⁺ é o CXCR4, o qual se liga somente em cepas com tropismo para células T (*T-Tropic*) que infectam linfócitos T, mas não macrófagos ou monócitos. O receptor CXCR4 possui um ligante natural derivado do fator do estroma (SDF-1). As células primárias T CD4⁺ exibem os co-receptores CCR5 e CXCR4 e podem ser infectadas por ambas cepas, M e T (FAUCI, 1996). A afinidade do HIV-1 a co-receptores específicos é um fator determinante para o tropismo celular das diferentes cepas do vírus. A importância fisiológica destes dois receptores é demonstrada em relatos de que indivíduos que possuem mutações nos genes *ccr5* e *cxcr4* são resistentes à infecção pelo HIV-1 (HAROUSE, 1991).

Nem todas as células infectadas pelo HIV, como os astrócitos, expressam moléculas CD4. Nestas células, o receptor para a gp 120 é a galactosil ceramida. Também as células epiteliais do intestino e vagina não possuem receptor CD4⁺, porém expressam galactosil ceramida (HAROUSE, 1991).

FIGURA 3 - SEQUÊNCIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE AS MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DOS LINFÓCITOS T CD4⁺ E O HIV.



FONTE: LEVY et al., 1996

2.1.5 Imunologia da infecção pelo HIV

A infecção causada pelo HIV-1 resulta no comprometimento das funções do sistema imunológico inato e adquirido. Os defeitos mais proeminentes são os da imunidade mediada por células e podem ser atribuídos à duas principais causas: a deficiência de linfócitos T CD4⁺ e a outros distúrbios do sistema imunológico. A maioria das manifestações da imunodeficiência, incluindo infecções e tumores, é devida a uma deficiência de células T CD4⁺. O marco da progressão da doença induzida pelo HIV-1 é a diminuição do número de células T CD4⁺ no sangue periférico, as quais estão presentes normalmente numa concentração de 1000 céls/mm³ e diminuem para menos de 100 céls/mm³ nos pacientes com SIDA completamente desenvolvida (ABBAS et al., 1999).

Na infecção pelo HIV o sistema imunológico é cronicamente ativado, através de múltiplos eventos tais como: proliferação dos linfócitos, aumento da secreção de citocinas, ativação dos monócitos e ativação das células T CD4⁺ e CD8⁺. Nos estágios iniciais da doença há hiperplasia dos linfonodos (FAUCI, 1993).

A imunodeficiência nos indivíduos infectados pelo HIV-1 é, em parte, resultado de distúrbios funcionais do sistema imunológico, independentemente da depleção de linfócitos. As replicações do vírus HIV são influenciadas por inúmeras citocinas que regulam o sistema imunológico, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6). Baixos níveis de citocinas são continuamente secretados mesmo quando o sistema imunológico está quiescente e esta quantidade aumenta quando ocorre um aumento da replicação do vírus. O HIV se replica melhor em células ativadas e o nível de carga viral aumenta quando o sistema imunológico é ativado, tanto através de infecções oportunistas como pela imunização através de antígenos vacinais (FAUCI, 1996).

Sub-populações de linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Th) como Th-1 e Th-2 influenciam na produção de certas citocinas. Quando ativadas, as células Th-1 produzem citocinas como: interferon gama (γ -IF), IL-2 e IL-12 que induzem a imunidade mediada por células, enquanto que as citocinas produzidas por Th-2 como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 induzem a resposta humoral. Recentes estudos têm sugerido que a mudança de sub populações Th-1 para Th-2 está associada com a progressão da doença (SCHUPBACH e GALLO, 2000).

O sistema imunológico também é constantemente ativado pela expressão

do HIV. A infecção crônica pelo HIV leva a uma constante produção dos antígenos virais, como a gp 120, que é capaz de ativar as células CD4⁺ pela sua ligação a molécula CD4. O efeito dessa permanente estimulação é a hiperativação crônica do sistema imunológico (FAUCI, 1996).

2.1.6 Curso da infecção pelo HIV

Apesar do curso da infecção pelo HIV poder variar de indivíduo para indivíduo, há um modelo comum a todos (Figura 4).

Cerca de 50-70% dos pacientes desenvolvem uma síndrome aguda, como uma mononucleose 3 a 6 semanas após a infecção primária, caracterizada por uma alta viremia e uma queda do número de células CD4⁺ no sangue periférico. A viremia aguda é seguida pela ativação das células CD8⁺, que são responsáveis pelo controle da replicação viral, através da citotoxicidade e da produção de citocinas. Durante este estágio, o HIV dissemina-se nos linfonodos (SCHWARTZ, 1999), onde ocorre a resposta imunológica específica com um declínio da viremia. Entretanto, esta resposta é inadequada para suprimir a replicação viral completamente e a expressão do HIV persiste nos linfonodos durante a fase de latência da doença (PANTALEO, 1999).

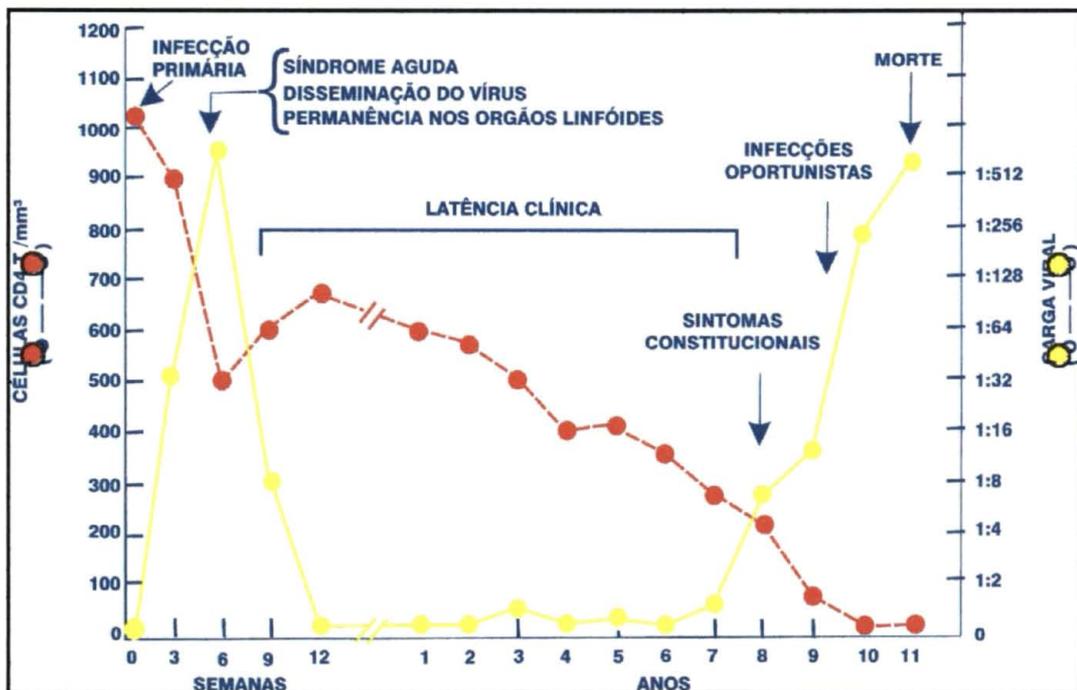
Após a infecção primária, a disseminação viral, o aparecimento da imunidade específica e o aparente declínio da replicação viral, a maioria dos pacientes tem um período de latência clínica que pode ser de vários anos (10-12 anos). Entretanto, o termo latência é errôneo pois nesta fase ocorre uma gradual deterioração do sistema imunológico, manifestado por uma depleção das células CD4⁺. Embora, a diminuição do número de células CD4⁺ ocorra sem aumento da concentração da carga viral plasmática, a taxa de replicação viral continua alta nos linfonodos (PANTALEO, 1993).

A replicação viral contínua nos linfonodos resulta na ruptura dos centros germinativos e das células dendríticas dos linfonodos e na liberação de virions para

a circulação. Nesta fase ocorre uma maciça produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e IL-6, com uma mudança de predomínio de linfócitos Th-2 sobre Th-1 e declínio das células CD4⁺ para menos de 50cél_s/μl .

Este declínio está associado com a deterioração do sistema imunológico e o aparecimento das manifestações clínicas da doença, ou seja, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ou SIDA constituída de sinais e sintomas, como infecções oportunistas, neoplasias, caquexia e demência (SCHWARTZ; NAIR 1999).

FIGURA 4 - CURSO DA INFECÇÃO DO HIV



FONTE: PANTALEO, 1993

2.2 MICOBACTÉRIAS

2.2.1 CLASSIFICAÇÃO

O gênero *Mycobacterium* é o único da família Mycobacteriaceae, sendo constituído pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* e mais de 80 espécies de micobactérias atípicas, incluindo espécies patogênicas, oportunistas e espécies não patogênicas (SOINI e MUSSER, 2001).

As espécies mais conhecidas são o *Mycobacterium tuberculosis* e o *Mycobacterium leprae*. A partir da década de 80, com o advento da SIDA, as micobactérias atípicas começaram a ser isoladas de um grande número de pacientes. Entre as micobactérias atípicas, a espécie mais comum é o *Mycobacterium avium* (EISENSTADT et al., 1995).

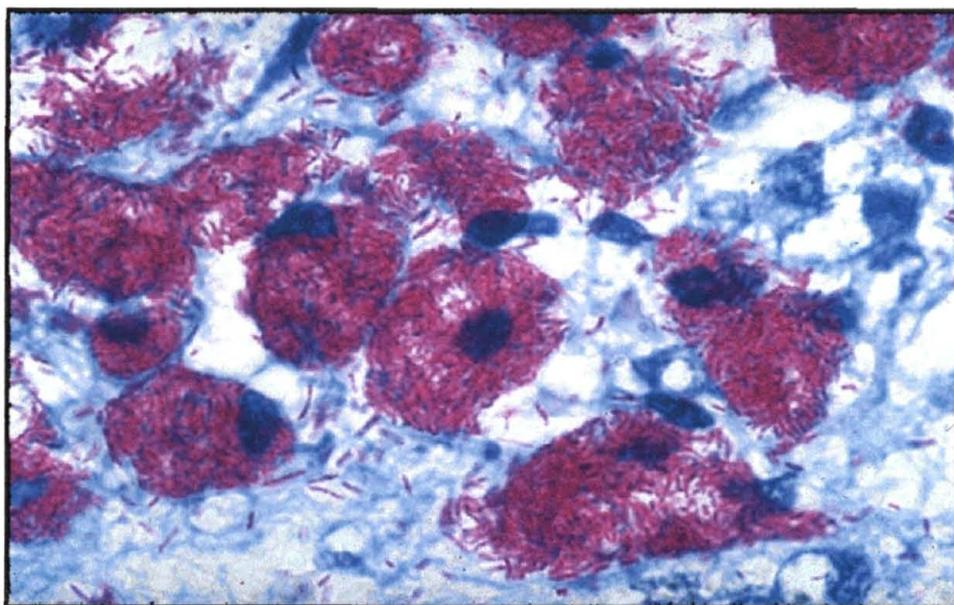
O complexo *M. tuberculosis* inclui também as espécies *M. bovis*, *M. microti* e *M. africanum*. *M. bovis*-BCG ou bacilo de Calmette-Guerin foi o nome dado em 1856 a variante bovina que apresenta uma virulência menor e é utilizado como vacina contra a tuberculose em muitos países. O *M. africanum* e o *M. microti* representam espécies fenotípicas intermediárias entre o *M. tuberculosis* e o *M. bovis* (METCHOCK; NOLTE; WALLACE, 1999).

O complexo *M. avium* (MAC) também conhecido como complexo *M. avium-intracellulare* (MAI) consiste de 28 sorotipos de duas espécies distintas, *M. avium* e *M. intracellulare*. Os sorotipos de 1 a 6, 8 a 11 e 21 são *M. avium*, enquanto que os sorotipos 7, 12 a 20, 22 a 28 são *M. intracellulare*. Existem três sub-espécies de *M. avium* classificadas de acordo com características fenotípicas e genéticas: *M. avium* subsp. *avium*, *paratuberculosis* e *silvaticum* (METCHOCK; NOLTE; WALLACE, 1999).

2.2.2 Características gerais das micobactérias

As bactérias do gênero *Mycobacterium* são representadas por bacilos retos ou ligeiramente curvos, com 0.2 a 0.7 μm de largura por 1.0 a 10.0 μm de comprimento, imóveis, não esporulados, sem conídios ou cápsulas, aeróbios e quimiorganótrófico (Figura 5) (HOLT et al., 1994)

FIGURA 5 - PRESENÇA DE *Mycobacterium avium* NO INTERIOR DOS MACRÓFAGOS - COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN



FONTE: www.medlib.med.utah.Edu/webpath/tutorial/aids030.html

As micobactérias não são coradas facilmente pelo método de Gram, porém, são consideradas gram-positivas. Apesar de todas as bactérias gram-positivas possuírem peptidoglicano (um heteropolímero formado por dois tipos de aminoaçúcares e de alguns aminoácidos) que determina a forma da célula bacteriana, nas micobactérias, as moléculas associadas a este polímero são predominantemente lipídios em vez de polissacarídeos como nas demais bactérias gram positivas. Os envelopes das micobactérias são constituídos de uma variedade de proteínas solúveis, carboidratos, lipídios e três macromoléculas insolúveis: arabinogalactano, peptidoglicano e ácidos micólicos. Esta característica confere às micobactérias propriedades singulares, como a resistência álcool-ácido, isto é, resistem à descoloração com álcool-ácido ou ácido mineral forte após coloração com

fucsina (McNEIL e BRENANN,1991). O conhecimento da estrutura da parede celular das micobactérias é fundamental para o entendimento de diferentes mecanismos tais como: resistência às drogas, antigenicidade e imunoreatividade, especialmente do processo de apresentação de antígenos pelas células acessórias, deposição de imunocomplexos, seqüelas e de outros aspectos imunopatogênicos como a formação de granulomas na tuberculose e persistência e reativação da doença na lepra e tuberculose (INDERLIED; KEMPER;BERMUDEZ,1993).

As micobactérias exibem crescimento lento ou muito lento em cultura dependendo da espécie. As colônias se tornam visíveis após 2 dias a 8 semanas de incubação em temperatura ótima, que pode variar de 30 a 45°C. A maioria das espécies cresce em substratos simples, utilizando amônia ou amino ácidos como fonte de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono. Na presença de sais minerais, podem apresentar coloração amarela, laranja ou rósea. Algumas espécies requerem luz para formar pigmentos (fotocromogênicas) e outras formam pigmentos tanto na luz como no escuro (escotocromogênicas). A morfologia colonial varia entre as espécies, o *M. tuberculosis* forma colônias rugosas com os bacilos compactados em forma de cordas, enquanto que o *M. avium* forma colônias lisas que crescem sem um modelo definido no cultivo primário (HOLT et al.,1994).

2.2.3 Epidemiologia da infecção pelo *M. avium* em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

O *M. avium* é ubíquo na natureza podendo ser isolado de fontes naturais como a água, solo, plantas e animais (FRY,1986). A fonte de infecção por *M. avium* nos pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ainda é desconhecida. Não existem evidências que ocorra transmissão pessoa a pessoa, e nem tampouco que fatores como idade, raça ou regiões geográficas exerçam influência sobre a infecção disseminada pelo *M. avium* Provavelmente a infecção é adquirida via trato gastrointestinal ou respiratório, uma vez que a colonização destas regiões anatômicas precede a infecção disseminada (HORSBURGH, 1991;McFADDEN, 1992; JACOBSON,1997).

Aparentemente a infecção disseminada resulta de uma infecção primária e não da reativação de uma infecção latente. Esta hipótese baseia-se no fato de que

se a aquisição do *M. avium* fosse por reativação da infecção latente, a sua incidência aumentaria com a idade, como ocorre com a tuberculose. Outro dado que favorece esta hipótese é a ausência de resposta humoral contra o *M. avium* em pacientes HIV positivos com infecção disseminada, sugerindo uma infecção primária recente, uma vez que estes pacientes perdem a capacidade de apresentar resposta humoral às infecções primárias (JACOBSON,1997, McFADDEN, 1992, HORSBURGH, 1991). A bacteriemia por *M. avium* ocorre em mais de 90% dos pacientes com doença disseminada (KONEMAN et al.,1997).

De uma forma geral, as infecções por *M. avium* ocorrem tardiamente no curso da infecção pelo HIV, estando correlacionadas com a contagem de linfócitos CD4⁺ menor do que 100celS/ μ l. Estima-se que mais que 50% dos pacientes com SIDA desenvolverão a infecção por *M. avium* no decorrer de sua vida sendo que em 20 a 25% dos casos a infecção acontece dentro de 24 meses após detectada a imunossupressão, isto é, contagem de linfócitos CD4⁺ < 200celS/ μ l (MAC.GREGOR et al.,1999). A infecção por *M. avium* em humanos, até o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, era raramente descrita. Apesar da alta exposição à bactéria, a incidência da doença clínica era muito baixa (< 10 casos/100.000 habitantes). Inicialmente, a infecção pulmonar era a principal manifestação da doença (INDERLIED et al.,1993). Antes da terapia anti-retroviral potente a infecção disseminada por *M. avium* costumava ocorrer em 15 a 24% do pacientes com SIDA (HORSBURGH, 1991).

No Brasil, são poucos os relatos referentes ao isolamento de *M. avium* em bacteriemia. AILY et al. (1999) analisaram 1521 amostras de sangue provenientes de pacientes com SIDA, no período de 1994 a 1997 no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo e encontraram uma prevalência de 9,9% de positividade para micobactérias. BARRETO et al. (1993) observaram uma prevalência de 18,4% para *M. avium* e de 7,2% para *M. tuberculosis* em aspirado de medula óssea. Esta pesquisa foi realizada de maio de 1990 à abril de 1992, no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, no Estado de São Paulo. Outro relato se refere a um estudo retrospectivo em vários tipos de amostras clínicas, onde se observou uma prevalência de 5% para *M. tuberculosis* e 17% para *M. avium* em amostras de sangue (RAMOS et al., 2000).

2.2.4 Patogênese e sintomatologia clínica da infecção pelo *M. avium* em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida.

As infecções causadas por micobactérias são exemplo clássico de doença controlada quase que inteiramente pela imunidade celular, envolvendo macrófagos e linfócitos T como células efetoras. A fagocitose e o processamento de antígenos pelos macrófagos e linfócitos B induz a resposta imunológica celular específica, incluindo a ativação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), macrófagos e de linfócitos T citotóxicos (CD 8⁺)(COLLINS, 1982).

A fagocitose do *M. avium* por monócitos e macrófagos ocorre principalmente através do receptor de complemento CR3. O receptor Fc também é utilizado para a invasão do microorganismo, sendo esta fagocitose associada com a produção de ânions superóxidos pelas células fagocitárias (WRIGHT e SILVER, 1983). Assim como o *M. tuberculosis*, o *M. avium* sintetiza a enzima superóxido dismutase, resultando numa inativação e menor produção do ânion superóxido (BERMUDEZ, ENKEL, YOUNG, 1989). A sobrevivência do *M. avium* dentro dos macrófagos está relacionada com a capacidade de inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, prevenindo assim o contato com enzimas proteolíticas. Na ausência da formação do fagolisossomo, o ambiente intracelular dos macrófagos permanece neutro ou alcalino, favorecendo a sobrevivência do patógeno e a diminuição da efetividade terapêutica (BACK, et al. 1990). Tem-se demonstrado que macrófagos de pacientes com SIDA são mais permissivos para o crescimento do *M. avium* do que macrófagos de indivíduos saudáveis. O plasma de pacientes com SIDA contém produtos virais e citocinas que influenciam negativamente o controle da infecção por *M. avium*. Além disto várias citocinas secretadas por macrófagos após a infecção por micobactérias são responsáveis pelo aumento da replicação viral do HIV (HOFFNER, KÄLLENIUS, SVENSON, 1992).

Apesar dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, além das células *natural killer* (NK), terem uma participação importante na resposta imunológica contra as micobactérias, pouco se sabe sobre o mecanismo envolvendo as micobactérias atípicas. Algumas cepas de *M. avium* induzem doença crônica por infecções pulmonares em camundongos, enquanto que outras cepas causam doença disseminada com alta taxa de mortalidade (GANGADHARAM, 1986).

A infecção disseminada pelo *M. avium* em pacientes com SIDA causa uma

doença progressiva, caracterizada por febre intermitente, calafrios, fraqueza, anorexia e perda de peso, sendo a maior causa da síndrome do "Wasting," ou caquexia isto é, a perda gradual acima de 10% do peso corpóreo. Setenta e sete por cento (77%) dos pacientes têm sinais e sintomas relacionados com o sistema gastrointestinal, como dor abdominal, diarreia, hepatomegalia e fosfatase alcalina elevada (HORSBURGH,1994; HAVLIK,1992; KEMPER, et al.,1992). Como o *M. avium* tem predileção pelos macrófagos, ocorre um envolvimento dos órgãos linfóides. Estudos anátomo patológicos demonstraram a presença do *M. avium* em linfonodos, fígado, baço, medula óssea e trato gastrointestinal, além de outros órgãos como tireóide, pâncreas, glândula adrenal, rins, músculo e cérebro (ELLNER et al.,1991).

A bacteriemia pelo *M. avium* ocorre em 86 a 98% dos pacientes com doença disseminada, com contagens de colônias na faixa de 10^1 a 10^3 CFU/ml, podendo chegar a 10^6 CFU/ml. As cargas bacterianas nos tecidos costumam ser de 10^2 a 10^5 mais altos do que no sangue. Altos números de bactérias encontrados no interior de monócitos e macrófagos, depois de prolongado tratamento, evidenciam a deficiência do sistema imunológico em debelar o crescimento intracelular das micobactérias. A diminuição do número de bactérias circulantes está diretamente relacionada com a eficácia da terapêutica (CHIU et al., 1990). A utilização da quantificação da bacteriemia nas triagens clínicas é baseada no pressuposto que a bacteriemia não diminui e nem desaparece espontaneamente, e que seu nível aumenta nos pacientes que não receberam tratamento (DAUTZENBERG et al., 1991). Alguns autores têm sugerido que a relação entre bacteriemia e o grau de infecção nos tecidos pode ser baixa (WILEY et al.,1990). Outros ainda sugerem que pacientes com doença disseminada pelo *M. avium* tem flutuações de bacteriemia com baixos níveis de micobacteriemia e culturas negativas intermitentes (INDERLEID et al., 1993; KEMPER, 1992).

O *M. avium* quando isolado em escarro e fezes de pacientes com SIDA, constitui-se em fator de risco para a doença disseminada, entretanto 64 - 75% dos pacientes que desenvolvem bacteriemia não apresentavam evidências de colonização prévia (CHIN, et al.,1992).

2.2.5 Epidemiologia da infecção pelo *M. tuberculosis* em pacientes HIV positivos

A frequência com que a infecção pelo HIV e o *M. tuberculosis* ocorrem simultaneamente é determinada pela epidemiologia de cada doença em uma determinada população. Altas taxas desta co-infecção são encontradas em desabrigados, usuários de drogas, população não branca, imigrante e refugiada. As primeiras observações da co-infecção tuberculose-HIV foram demonstradas na África (COCK, et al.,1992). Nos países desenvolvidos a tuberculose estava controlada até os meados dos anos 80, quando então a infecção pelo HIV mudou a sua epidemiologia em todo o mundo (SEPKOWITZ et al. ,1995). Enquanto que a tuberculose é a doença oportunista mais comum em pacientes infectados pelo HIV nos países em desenvolvimento; nos países industrializados a doença oportunista que mais causa morbidade entre os pacientes com SIDA é o *Pneumocystis carinii*. Em estudos realizados na Uganda, a tuberculose contribuiu em 30-40% sobre as mortes das pessoas infectadas com o HIV (GAYLE, 2001).

Assim, a bacteriemia por *M. tuberculosis* em pacientes HIV positivos tem sido descrita com maior incidência nos países em desenvolvimento, enquanto que nos países desenvolvidos ocorre uma prevalência maior de bacteriemia por *M. avium* (Tabela 1).

Estudos prospectivos no Estados Unidos e França encontraram taxas de bacteriemia por *M. tuberculosis* de 7/27 e 4/165, respectivamente, em pacientes HIV positivos (CLARK et al.,1991). Contudo, a maioria dos estudos se referem a um pequeno número de casos (SALTZMAN, et al.,1986; BARBER, CRAVEN, McCABE,1990). Em estudo realizado no Instituto de Pesquisas Médicas em Johannesburg na África do Sul, encontrou-se uma prevalência de 22% de *M. tuberculosis* e de 10% para *M. avium* em pacientes HIV positivos (GOTTBERG, et al. 2001).

TABELA 1: PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR MICOBACTÉRIAS EM PACIENTES HIV POSITIVOS EM DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS

Ano	Localização geográfica	N ^o de espécies isoladas/N ^o total de pacientes (percentual)	
		<i>M. avium</i> (%)	<i>M. tuberculosis</i> (%)
Hemocultura			
1988	Houston	47/47 (100)	0/47
1988	Madrid ¹	1/16 (6)	15/16 (94)
1988	London	13/13(100)	0/13
1989	Los Angeles	49/61 (80)	12/61 (20)
1990	New York	69/71 (97)	2/71 (3)
1992	Berlin	7/10 (70)	3/10 (30)
1992	Kampala, Uganda	0/4	4/4 (100)
1995	Canada	190/194 (98)	0/194
1996	Vancouver, Bristish Columbia, Canada	291/298 (98)	3/298 (1)
2001	Johannesburg	7/71(10)	16/71(22)

FONTE: MONTESSORI , 1996

A infecção pelo HIV altera o curso da tuberculose. Entre as pessoas infectadas pelo HIV, 7-10% desenvolvem tuberculose ativa a cada ano. Normalmente, 8% das pessoas não infectadas pelo HIV adoecem de tuberculose ao longo de sua vida. Dentre os pacientes HIV positivos com infecção primária por *M. tuberculosis*, 37% desenvolvem doença ativa nos 6 primeiros meses enquanto somente 2-5% de pacientes HIV negativos desenvolvem a doença nos dois primeiros anos. O HIV também confere anergia em grande número de pessoas infectadas, sendo difícil a interpretação do Teste de Mantoux, visto que a anergia ocorre principalmente entre os pacientes com baixo número de linfócitos CD4⁺. Outro fator importante é que a tuberculose evolui rapidamente nos pacientes com SIDA, visto que a infecção pelo HIV interfere na absorção das drogas anti-tuberculostáticas (SEPKOWITZ et al., 1995; SELWYN et al., 1989).

2.2.6 Patogênese e sintomatologia clínica da infecção pelo *M. tuberculosis* em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

A infecção pelo *M. tuberculosis* se dá pela inalação de aerossóis contendo bacilos, sendo a transmissão predominantemente por via aérea. Neste estágio, a destruição das micobactérias depende da resposta imunológica e fatores intrínsecos de virulência das micobactérias. As micobactérias que sobrevivem à destruição inicial podem se proliferar e romper os macrófagos. Nesta fase, os monócitos e outras células inflamatórias migram para o pulmão. Estes monócitos se diferenciam em macrófagos que novamente podem destruir ou não estas micobactérias. A resposta celular específica pelos linfócitos T aos antígenos das micobactérias se desenvolve após 2 a 3 semanas da infecção. Após a infecção primária, o crescimento bacteriano pode entrar numa fase de latência (90% dos casos), progredir para uma doença primária ou disseminada com micobacteriemia, meningite e tuberculose miliar. Dependendo das condições imunológicas do paciente, pode ocorrer a reativação do *M. tuberculosis*, meses ou anos após a infecção primária (CREVEL; OTTENHOFF; MEER, 2002).

A tuberculose é uma doença que é controlada quase que inteiramente pela imunidade celular, envolvendo macrófagos e linfócitos T como células efetoras. O *M. tuberculosis* ativa o sistema complemento. Fragmentos de C3 ativados na superfície do bacilo mediam a sua entrada nos macrófagos através dos receptores de complemento CR1 e CR3, moléculas presentes na superfície dos macrófagos que fazem parte da família das integrinas (SCHLESINGER et al., 1993). Esta ligação inicia a internalização da bactéria pelos macrófagos que destroem os bacilos através da ação de enzimas e citocinas como o interferon gama (IFN- γ) ou citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF). Os bacilos do *M. tuberculosis* não eliminados por estes mecanismos se instalam nos macrófagos utilizando-os como sítios de replicação (ISBERG, 1991). Isto se deve ao fato de que os componentes da parede celular das micobactérias podem inibir a fusão dos lisossomos com vacúolos fagocitários, bloqueando a atividade das hidrolases ácidas (CREVEL; OTTENHOFF; MEER, 2002). Outro mecanismo de escape das micobactérias é a liquefação, causada pelos macrófagos que liberam proteinases e lipases, quebrando o granuloma no seu centro necrótico, o que permite uma exacerbação no crescimento bacteriano. Com o aumento da concentração de

antígenos, as paredes dos pulmões começam a sofrer um processo de destruição tecidual, ocorrendo uma disseminação para outros sítios anatômicos. A doença pode progredir rapidamente, com mais liquefação e sem uma resposta imunológica efetiva, levando o paciente a óbito (SCHARER e MCADAM, 1995).

A tuberculose é um exemplo de infecção na qual coexistem a imunidade protetora e a hipersensibilidade patológica, sendo as lesões causadas principalmente pelas respostas do hospedeiro. Devido à hipersensibilidade celular tardia, macrófagos e linfócitos são rapidamente acumulados e podem tornar-se ativados onde quer que o bacilo da tuberculose e seus antígenos estejam. A reação causa a aceleração da formação do granuloma e a formação deste possibilita a destruição do bacilo da tuberculose, quando não destruídos pelos macrófagos. Em outras palavras, a reação granulomatosa pode parar a progressão da reinfecção exógena, além de parar a progressão de muitas lesões do sistema hematogênico originado dos pulmões e fígado, impedindo a reativação endógena. Quando a reativação endógena e a reinfecção exógena ocorrem com um pequeno número de bacilos, a hipersensibilidade é inteiramente benéfica ao paciente. Entretanto, se os macrófagos não desenvolvem suficiente poder bactericida, os bacilos continuam a se multiplicar intracelularmente com a progressão da doença. Com a presença de grande quantidade de bacilos, a reação de hipersensibilidade por si só causa morte celular e destruição tecidual conhecida como caseificação (DANNENBERG, 1991).

2.2.7 Co-infecção HIV- Micobactérias

A marca da infecção pelo HIV é a progressiva deterioração e depleção dos linfócitos CD4⁺, juntamente com o comprometimento dos macrófagos e monócitos. O HIV altera as funções dos macrófagos e dos linfócitos CD4⁺, que participam na formação do granuloma e na eliminação das micobactérias. Pacientes com alto número de linfócitos CD4⁺ apresentam as formas clássicas da tuberculose, enquanto que pacientes imunossuprimidos com diminuição dos linfócitos CD4⁺ apresentam tuberculose disseminada ou em sítios diferentes tais como: abscessos cerebrais, meningites, tuberculose ostéo-cutânea (SEPKOWITZ, et al., 1995; SMALL; JACOBSON, 1994).

Em pacientes HIV positivos há dificuldade na eliminação das bactérias do sítio de infecção permitindo o crescimento e proliferação indiscriminada dos bacilos,

podendo ocorrer a reativação de uma infecção latente ou a reinfeção por uma segunda cepa de micobactéria. Os bacilos podem se difundir pelo tecido necrotizado sendo uma causa adicional para a disseminação das micobactérias. Macrófagos que não foram devidamente ativados podem fagocitar os bacilos e estes se replicar dentro dos macrófagos em alta concentração. Indivíduos imuno-competentes conseguem inibir a replicação ou destruir o bacilo, enquanto que pessoas infectadas pelo HIV não conseguem debelá-lo devido à deficiência (HAVLIR e BARNES, 1999).

As citocinas como o interferon gama (IFN- γ) que auxiliam na eliminação das micobactérias, podem intensificar a replicação do HIV. Antes do advento da SIDA, 85% dos casos de tuberculose eram pulmonares e 15% eram extrapulmonares.(FARER et al., 1979). Atualmente, cerca de 38% dos pacientes HIV positivos com tuberculose têm somente a forma pulmonar, 30% têm a forma extrapulmonar e 32% têm ambas as formas (SMALL et al. ,1991).

A principal diferença entre as manifestações clínicas das infecções causadas por *M. tuberculosis* e *M. avium* está na virulência dos patógenos e na resposta da imunidade mediada por células. O *M. tuberculosis* é intrinsecamente mais virulento, pois causa doenças em indivíduos imunocompetentes, diferentemente do *M. avium*. A tuberculose geralmente precede o diagnóstico da SIDA, enquanto que a infecção pelo *M. avium* causa doença em estágios avançados da SIDA, quando a imunidade está severamente afetada, com contagem de linfócitos CD4⁺ baixos (MODILESVIKY, SATTLER, BARNES,1989).

Em pacientes com contagem de linfócitos CD4⁺ ≥ 200 cel/ μ l, os achados de doença são similares aos observados em pacientes HIV negativos (MODILESVIKY, SATTLER, BARNES,1989). Aproximadamente 5% dos pacientes HIV positivos com tuberculose pulmonar apresentam bacilos álcool-ácido resistentes no escarro, mesmo com radiografia normal (HAVLIR e BARNES, 1999).

A maioria dos pacientes com bacteriemia por *M. tuberculosis* apresentam a contagem de linfócitos CD4⁺ entre 15 e 114 cel/ μ l. Os sintomas de bacteriemia por *M. tuberculosis* incluem adenopatia e níveis elevados de fosfatase alcalina, no entanto, REYN (1999) sugere que mais estudos serão necessários para uma melhor avaliação desses dados. Sabe-se que a bacteriemia se constitui na primeira manifestação da infecção disseminada, sendo que as diferenças observadas durante a fase de bacteriemia dependem de vários fatores, incluindo o número de

micobactérias, a severidade da infecção, a virulência do microorganismo e a variação da resposta imunológica do hospedeiro. Pelo fato que vários pacientes com bacteriemia geralmente não apresentam achados radiográficos específicos, o diagnóstico na maioria das vezes é tardio. Portanto, sempre se deve suspeitar e investigar a micobacteriemia quando a prevalência de tuberculose na população é alta, o paciente é imunosuprimido e apresenta febre sem foco ou outros sintomas inespecíficos (CLARK et al.,1991).

2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOBACTÉRIAS

2.3.1 Baciloscopia

As micobactérias não se coram facilmente através de métodos convencionais como a coloração de Gram. A alta quantidade de lipídios presentes na parede celular das micobactérias não permite a fixação dos corantes usados na coloração de Gram. Dois tipos de colorações são realizados normalmente:

1- coloração de Carbofucsina (mistura de fucsina com fenol); que incluem as colorações de:

a- Ziehl-Neelsen (coloração a quente)

b- Kinyoun (coloração a frio)

c- Ziehl-Gabbet (coloração a frio)

2- coloração de Fluorocromos: com auramina O. (KONEMANN,1997)

As micobactérias formam complexos estáveis com corantes arilmetanos como a fucsina e auramina O. Apesar de que o exato mecanismo de álcool-ácido resistência não ter sido completamente elucidado, o fenol age permitindo a penetração do corante primário na parede celular das micobactérias e as altas concentrações de ácidos micólico retêm o corante primário, mesmo após ser submetido a descorantes combinados de álcool - ácido ou ácidos minerais fortes (METCHOCK,2001).

Apesar da baciloscopia ser menos sensível que a cultura (na baciloscopia é necessário uma quantidade de 5×10^3 a 5×10^4 UFC/ml enquanto que na cultura é necessário de 10 a 100 bacilos viáveis), esta permite a detecção precoce de micobactérias e possibilita ao clínico direcionar os procedimentos necessários, ainda que não possibilite a diferenciação entre as espécies. A coloração deve ser realizada em todos os materiais de cultura que forem suspeitos de conter micobactérias (METCHOCK,2001).

2.3.2 Cultura

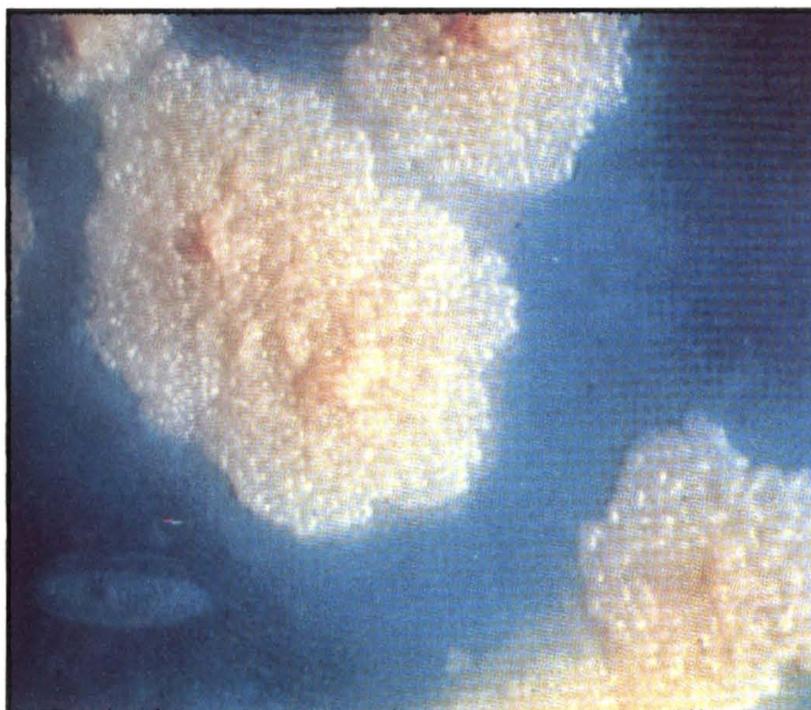
A cultura é o método bacteriológico de diagnóstico mais utilizado, por ser sensível e específico para identificar as micobactérias. É um complemento da

baciloscopia, que permite o diagnóstico não só dos casos avançados, intensamente bacilíferos, como também dos casos mais recentes com eliminação bacilar discreta. A cultura é indicada nas seguintes situações: na confirmação diagnóstica de casos com baciloscopia persistentemente negativa de indivíduos com sintomas clínicos e radiológicos de tuberculose pulmonar; no diagnóstico das formas extrapulmonares nas quais a baciloscopia é quase sempre negativa e no diagnóstico diferencial de outras doenças cujos quadros clínicos sejam semelhantes aos da tuberculose (BRASIL. **Manual de bacteriologia da tuberculose**, 1994).

Rotineiramente, o procedimento de cultura utiliza meio solidificado que podem ser divididos em meio contendo ovo ou base de ágar. O meio de cultura mais utilizado para isolamento de micobactérias é o de Löwenstein-Jensen (L-J), que é um meio solidificado à base de ovo e contém glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Este meio permite o crescimento da maioria das espécies micobacterianas de interesse médico (Figura 6). O meio de Löwenstein-Jensen é o meio padronizado pelo Ministério da Saúde do Brasil para o uso em laboratórios de referência (BRASIL. **Manual de bacteriologia da tuberculose**, 1994). O meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 é comumente utilizado no subcultivo para estocagem de cepas. É o meio escolhido para o preparo do inóculo para testes de resistência e outros testes "*in vitro*", sendo utilizado para a recuperação de micobactérias presentes em baixa contagem em materiais como o liquor (METCHOCK, 2001).

FIGURA 6 - COLÔNIAS DE *M. avium* EM MEIO DE LÖWENSTEIN-JENSEN

FONTE: BARON;PETERSON;FINEGOLD, 1994

FIGURA 7- COLÔNIAS DE *M. tuberculosis* EM MEIO DE LÖWENSTEIN-JENSEN

FONTE: BARON;PETERSON;FINEGOLD, 1994

2.3.3 Identificação bioquímica

As micobactérias devem ser identificadas sempre que possível até o nível de espécie. De acordo com os métodos tradicionais, as micobactérias são identificadas inicialmente pelo tempo de crescimento, morfologia colonial e produção ou não de pigmentos (RUNYON; SELIN e HARRIS, 1959). Esta triagem inicial deve ser realizada para se obter uma identificação presuntiva e direcionar os testes bioquímicos necessários. Os métodos tradicionais estão bem estabelecidos, padronizados e são relativamente econômicos. O problema decorre da lentidão e limitação na identificação das espécies. Os principais testes para identificação bioquímica são os seguintes: a) Produção de niacina; b) Redução de Nitrato; c) Teste da Pirazinamidase; d) Reação da Catalase a 68°C; e) Hidrólise do Tween 80; f) Urease; g) Beta Glicosidase (BRASIL, Manual de bacteriologia da tuberculose, 1994).

2.3.4 Métodos alternativos para a identificação de micobactérias

2.3.4.1 Sistemas automatizados de monitoramento contínuo

Com o objetivo de permitir que os procedimentos de hemoculturas se tornassem mais eficientes, vários sistemas automatizados foram desenvolvidos. Dentre estes o sistema automatizado de monitoramento contínuo permite detecções mais rápidas do crescimento bacteriano, diminuição na mão de obra dos técnicos de laboratório, não há necessidade de repique cego e subcultivo ao final da incubação (REIMER, WILSON, WEINSTEIN, 1997). Este sistema permite monitorar o crescimento bacteriano de modo contínuo, a cada 10 minutos. Os dados coletados são armazenados em um *software* e pelo sistema de algoritmo permite-se determinar o crescimento bacteriano. Em um único equipamento estão englobados a estufa, o sistema de monitoramento e um mecanismo de agitação permanente. Entre estes sistemas incluem-se os seguintes equipamentos: Sistema *BacT/Alert[®]*

(Organon Teknika Corp. Durham, North Carolina, USA); *Bactec 9000 MB System*^R (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems San Jose Calif. USA) e ESP II System^R (AccuMed International, Welake, Ohio, USA)

O Sistema *BacT/Alert* foi o primeiro sistema automatizado de monitoramento contínuo comercialmente desenvolvido. Emprega um sensor colorimétrico e reflete luz para o monitor na presença e produção de dióxido de carbono (CO₂) dissolvido no meio de cultura. Quando ocorre crescimento bacteriano produzindo CO₂, há mudança na coloração do sensor que muda de azul esverdeado para amarelo. Quando o sensor muda de coloração aumenta a luz refletida e em consequência, aumenta o sinal da voltagem. Estes sinais são armazenados e analisados através de algoritmo que sinaliza como positivo através de um alarme sonoro (REIMER, WILSON, WEINSATEIN, 1997).

O *Bactec 9000 MB System* utiliza o caldo *Middlebrook 7H9* e silicone impregnado de rutênio como marcador para o oxigênio para detectar o crescimento das micobactérias. A grande quantidade de oxigênio presente inicialmente no meio inibe a fluorescência do complexo de rutênio, mas com o crescimento das micobactérias o oxigênio é depletado do meio e a fluorescência aparece quando exposto à luz ultravioleta a 365 nm.

O *ESP II System* é baseado na mudança de pressão do espaço aéreo acima do meio de cultivo, resultante da formação de gás pelo crescimento bacteriano.

Os três sistemas têm características operacionais similares e oferecem tempos similares na detecção e recuperação das micobactérias, sendo superior ao tempo obtido em meio solidificado (METCHOCK, 1999).

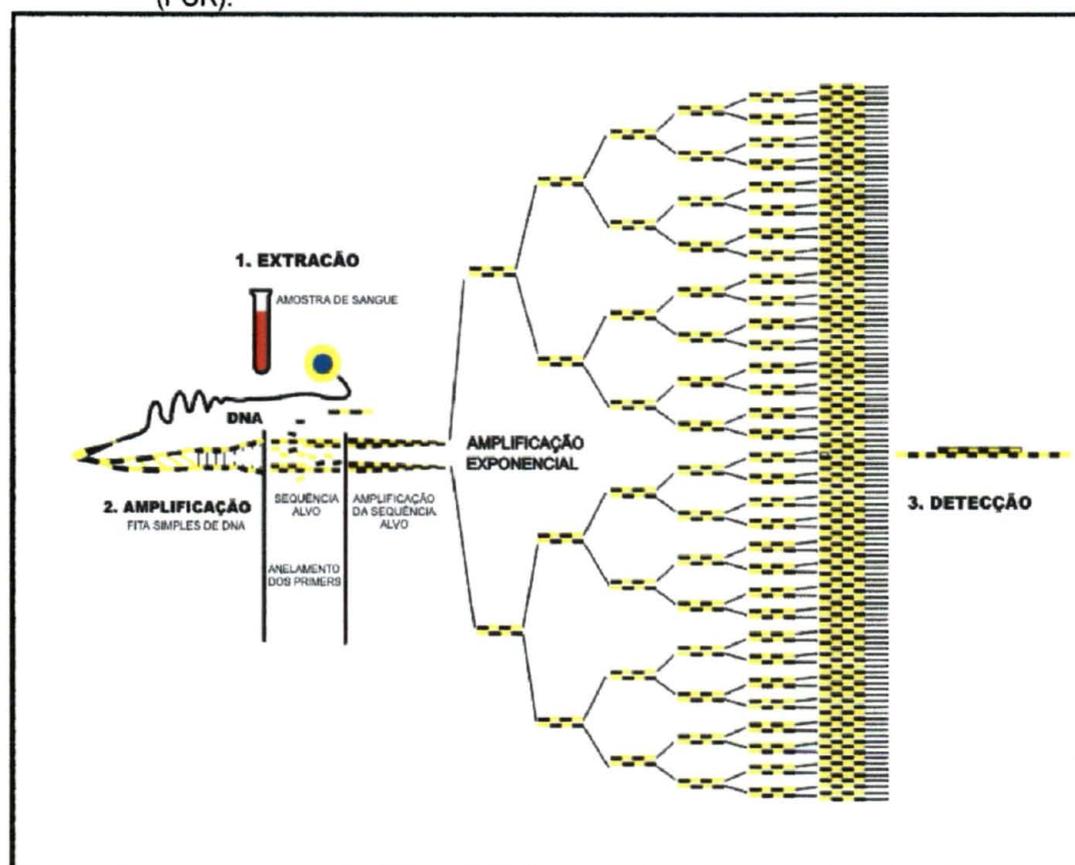
2.3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O diagnóstico acurado e rápido é essencial para o correto tratamento de pacientes com infecções. As micobactérias isoladas são tradicionalmente identificadas ao nível de espécies através de testes fenotípicos e bioquímicos. Entretanto, as reações bioquímicas podem variar dentro de uma mesma espécie e muitas vezes a identificação definitiva não é obtida. Em razão dos testes bioquímicos serem lentos e muitas vezes com resultados ambíguos as técnicas moleculares

começaram a ganhar espaço dentro dos laboratórios na identificação das espécies de micobactérias (SOINI E MUSSER, 2001). Em 1990, a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi introduzida na identificação das micobactérias (ASLANZADEH, 1997).

O diagnóstico através da PCR é feito pela extração, amplificação e detecção do DNA do microorganismo. Esta técnica permite que se amplifique milhões de vezes regiões específicas do DNA bacteriano, através de repetições cíclicas de processos que reproduzem o mecanismo que ocorre normalmente nas células durante a replicação do DNA. A PCR constitui-se de um processo desenvolvido em três etapas equivalentes a um ciclo, que se repete determinado número de vezes. Um ciclo consiste nas etapas de desnaturação, hibridização e extensão do DNA (Figura 8).

FIGURA 8 – MODELO ESQUEMÁTICO DAS ETAPAS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).



FONTE:BARON, PETERSON, FINELGOLD, 1994

O processo se realiza em um termociclador, um instrumento que controla e alterna automaticamente as temperaturas em períodos programados de tempo, por um número determinado de ciclos de PCR (geralmente entre 30 a 40 ciclos). A desnaturação por aquecimento (94-95°C) separa a fita dupla do DNA em duas fitas simples. As pontes de hidrogênio, que ligam as bases entre si, são fracas e se rompem a altas temperaturas, enquanto que as ligações entre a desoxirribose e as moléculas de fosfato, que são ligações covalentes e, portanto mais fortes, permanecem intactas. Na replicação do DNA, cada fita serve como molde para a síntese de outra fita através de um mecanismo semiconservativo. Deste modo existe um inicializador ("*primers*") de RNA que é sintetizado e é complementar ao molde, permitindo que a síntese da nova fita de DNA se inicie. Os "*primers*" são orientados de tal modo que as duas fitas novas de DNA sejam complementares e constituam uma segunda cópia da seqüência alvo original. A hibridização dos "*primers*" ocorre em temperaturas mais baixas (45-65°C). A temperatura ótima de hibridização é determinada empiricamente e depende de vários fatores, incluindo o número de ligações citosina-guanina dos *primers*, que determinam a especificidade da reação e delimitam a seqüência alvo. Finalmente, a síntese enzimática do DNA a 72°C pela *Taq* polimerase resulta na amplificação exponencial do DNA alvo.

A *Taq* polimerase é uma enzima termoestável recombinante, extraída da bactéria *Thermus aquaticus* e por ser termo resistente, permite a automação que é feita com o uso do termociclador, que cicla rapidamente entre diferentes temperaturas. A *Taq* DNA polimerase sintetiza exclusivamente na direção 5'-3'. Portanto os nucleotídeos livres na solução agregam-se somente à extremidade 3' dos iniciadores, construindo uma fita complementar de seqüência do DNA-alvo. O produto amplificado é então detectado e documentado. Um dos métodos de detecção é pela eletroforese em gel de agarose e corado pelo brometo de etídio, sendo o produto visualizado pela exposição a luz ultravioleta num transiluminador. Utilizando um marcador de DNA contendo fragmentos com número de pares de bases conhecido, é possível avaliar se o fragmento amplificado possui o tamanho esperado (ERLICH, GELFAND, SNINSKY, 1991).

2.3.4.3 Uso da PCR na identificação de micobactérias

Devido à característica de crescimento lento das micobactérias e a necessidade de um inóculo significativo para identificação das espécies, vários métodos que diminuem o tempo de identificação, como métodos moleculares por amplificação dos ácidos nucleicos foram desenvolvidos (SOINI e MUSSER, 2001)

Para a identificação molecular do *M. tuberculosis*, diferentes "primers" para a amplificação de diferentes seqüências estão descritos. Os "primers" podem ser espécies-específicos ou gênero-específicos. Uma vez amplificado o DNA, as características dos ácidos nucleicos das micobactérias podem ser rapidamente identificadas. Testes de PCR com "primers" espécies específicos são os mais utilizados (SHAWAR, et al.,1993). Incluindo os "primers" para detectar elementos genéticos que codificam a proteína do choque térmico (65-KDa) (PAO et al., 1990) e seqüências de inserções como IS 6110, que são repetitivas de a 1 a 20 vezes nos cromossomos dos membros do complexo do *M. tuberculosis*. (EISENACH, et al., 1990). Um estudo interlaboratorial mostrou que a sensibilidade da PCR para a identificação do *M. tuberculosis* varia de 50 a 100% e a especificidade é de 95-100%, dependendo dos diferentes protocolos e métodos de extrações utilizados (NOORDHOEK et al.,1994).

Para a identificação molecular do *M. avium*, diferentes "primers" dirigidos para as seqüências de inserção IS 1245 e para os genes *mig* e *hp65* têm sido utilizados (BEGGS, STEVANOVA e EISENACH, 2000). Porém a amplificação do gene 16S rRNA é uma das mais utilizadas (KIRSCHBER et al.,1993; KULSKI, et al.,1995; KOX et al.,1997).

A sensibilidade da PCR é dependente de técnicas de extração do DNA genômico, parâmetros de ciclagem e dos métodos utilizados para identificar e detectar os produtos da amplificação. Devido à alta quantidade de ácidos graxos presentes na parede celular das micobactérias, estes organismos são resistentes ao procedimento de lise. Muitos laboratórios têm utilizado técnicas de hibridização, com sondas marcadas. A sensibilidade da reação é proporcional ao tipo de sinal complexado à sonda. As sondas marcadas com P32 são as mais sensíveis, mas devido aos problemas de manuseio e descarte desses materiais radioativos, outras alternativas estão sendo desenvolvidas, como sondas conjugadas com enzimas, marcadas com fosfatase alcalina e biotina e detectadas colorimetricamente ou por

quimiluminescência (SEPKOWITZ et al. ,1995).

A sensibilidade da PCR pode ser melhorada pela amplificação do produto de DNA em uma segunda PCR com um segundo par de "*primers*" desenhado para amplificar um segmento mais interno ("Nested" PCR). Neste método os cuidados com a contaminação devem ser maiores (WILSON et al.,1993).

Os produtos da PCR podem ter uma aplicabilidade variada de usos. Os elementos repetitivos do DNA presentes nas micobactérias podem ser usados como marcadores em estudos epidemiológicos. As cepas podem ser identificadas pelas técnicas de "*fingerprinted*" através do crescimento bacteriano, extração do DNA, digestão com enzimas de restrição, técnicas de "blotting" e sondas dos elementos repetitivos. Os resultados podem ser comparados com análises computadorizadas. Estas análises são úteis nos estudos de transmissão da tuberculose, de cepas multi-resistentes, ou em estudos de reativação ou reinfecção da doença (RAMASWAMY e MUSSER,1998).

Existem 2 sistemas comerciais disponíveis para a identificação molecular do *M. tuberculosis*, diretamente de amostras clínicas, aprovadas pelo FDA (*Food Drugs Administration*), E-MTD Gen-Probe (San Diego, Calif.USA), é um teste baseado na amplificação mediada pela transcrição. A sensibilidade quando comparado com cultura para amostras respiratórias é em torno de 90.9-95.2% e a especificidade de 98.4-100%. O outro teste disponível é através da PCR do gene 16S rRNA do *M. tuberculosis* (*Amplicor MTB assay, Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J USA*). A sensibilidade desse teste quando comparada com cultura para amostras respiratórias é de 79.4-91.9% e a especificidade de 99.6-99.8%. Este teste está aprovado pelo FDA somente para amostras respiratórias com baciloscopias positivas porque a sensibilidade do teste é baixa para amostras respiratórias com baciloscopia negativas de 40.0-73.1%.

Outro sistema comercial disponível para identificação de espécies de micobactérias a partir de culturas é o AccuProbe Gen-Probe (*San Diego, Calif. USA*). O teste utiliza sondas espécies específicas de DNA que hibridizam com rRNA liberado da bactéria. As sondas são marcadas com éster de acridina e medidas através de quimiluminescência. A sensibilidade varia de acordo com a espécie em identificação. (SOINI; MUSSER, 2001)

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O HIV-1 infecta primariamente as células T auxiliares que expressam moléculas CD4+ e os macrófagos. Como os linfócitos T são essenciais tanto para a resposta imunológica humoral como celular contra diferentes patógenos, a perda destes linfócitos constitui-se na maior razão pelo qual os pacientes com SIDA tornam-se suscetíveis a tantas infecções oportunistas e neoplasias (ABBAS, 1999). Dentre estas infecções oportunistas, as micobactérias aparecem na categoria C do quadro clínico da SIDA, o qual é caracterizado por uma grave deficiência de linfócitos T CD4 e infecções graves.

O diagnóstico correto e rápido das infecções é essencial para um direcionamento terapêutico rápido e eficaz nestes pacientes (ASLANZADEH, 1997).

Os métodos tradicionais utilizados para o diagnóstico de infecções por micobactérias são a bacterioscopia, a cultura e a identificação bioquímica; sendo a hemocultura considerada o método padrão ouro.

Como para a realização da cultura necessita-se de uma grande quantidade de micobactérias (mínimo de 100 ufc/ml), e ainda o seu crescimento é lento em meios de cultura, a identificação das micobactérias pode levar de dias até semanas através desta metodologia. Portanto, têm-se investido esforços no desenvolvimento de técnicas que permitam uma rápida identificação das micobactérias em amostras clínicas (SEPKOWITZ et al., 1995).

Métodos moleculares como a PCR oferecem uma alta sensibilidade e especificidade para a detecção de micobactérias em amostras clínicas de pacientes imunodeprimidos (SEPKOWITZ. et al., 1995). Embora vários estudos têm proposto diferentes métodos de amplificação e diferentes métodos de extração do DNA para o diagnóstico de micobactérias, a padronização de um método efetivo ainda não foi definida (FERRARIO, 2001).

São objetivos deste trabalho:

- Padronizar um método de extração de ácidos nucléicos de micobactérias a partir de amostras de hemocultura.
- Relacionar os resultados da hemocultura com a PCR, para verificar a sensibilidade e especificidade da PCR na detecção de micobactérias em amostras de sangue periférico
- Verificar a prevalência da infecção causada por *M. avium* e por *M. tuberculosis* em pacientes com SIDA, através da PCR do sangue periférico e hemocultura.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

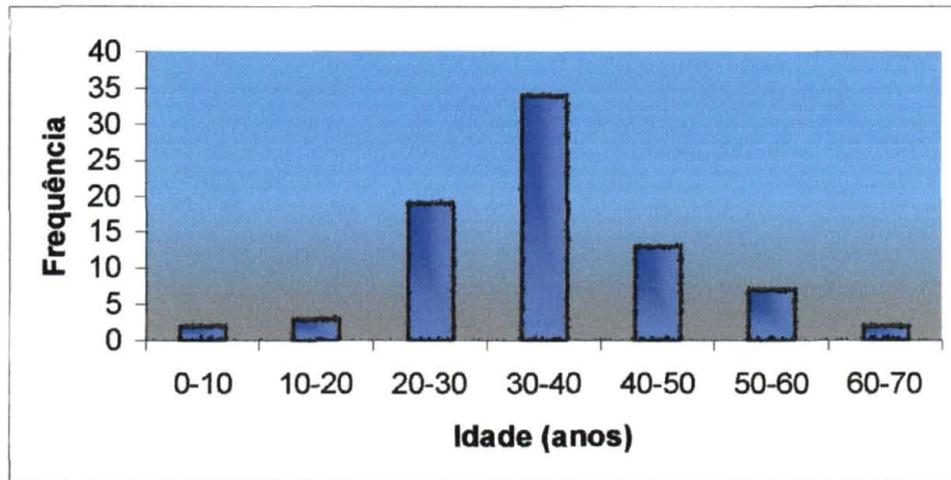
De abril de 2001 a fevereiro de 2002, foram investigados 80 pacientes com infecção pelo HIV-1, diagnosticados segundo o Protocolo da Coordenação Nacional DST/AIDS do Ministério da Saúde (CN DST/AIDS-MS), isto é todas as amostras foram submetidas a dois testes pelo método de ELISA que devem obrigatoriamente, ser testadas por duas metodologias e antígenos distintos. As amostras positivas ou não caracterizadas nos dois testes de triagem foram submetidas a testes confirmatórios; (Brasil, Diagnóstico sorológico do HIV- Teste de Triagem, 1997)

Entre os 80 pacientes estudados, 49 (61,2%) eram homens e 31 (38,7%) eram mulheres. A idade variou entre 7 a 64 anos, com idade média de 35 anos e mediana de 32 anos, Gráfico 1.

Todos os pacientes foram selecionados com o termo de consentimento livre e esclarecido, junto ao Serviço de Infectologia dos seguintes hospitais: Hospital Oswaldo Cruz, Hospital de Clínicas, Hospital do Trabalhador e Hospital Nossa Senhora das Graças, todos localizados na cidade de Curitiba, PR. Os recrutamentos desses pacientes foram realizados a partir do acesso de dados dos números de linfócitos T CD4⁺ dos pacientes em diversas unidades laboratoriais com a triagem clínica dos médicos infectologistas.

Os critérios de inclusão foram suspeita clínica de micobacteriemia como febre persistente e, preferencialmente contagem de linfócitos T CD4⁺ ≤ 100 cels/ μ l.

GRÁFICO -1 FREQUÊNCIA DE PACIENTES COM SIDA E SUSPEITA DE MICOBACTERIEMIA EM RELAÇÃO À IDADE



4.2 AMOSTRAS DE SANGUE

Foram coletados em média 8 ml de sangue total. Destes, 3 ml foram adicionados em tubos *Vacutainer*^R (Becton-Dickinson, Plymouth, United Kingdom), contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético) para a extração do DNA genômico e realização da PCR diretamente do sangue periférico. Cinco ml do sangue total foram adicionados aos frascos de hemocultura (MB/BacT[®], Organon Teknika Corp. Boxtel, Netherlands), específicos para o crescimento de micobactérias composto por caldo Middlebrock7H9 (0,47%*m/v*), lisado pancreático de lisina (0,1%), glicerol (1,0%*m/v*), SPS (0,025%*m/v*) em água purificada (Figura 9).

4.3 CONTAGEM DE LINFÓCITOS TCD4⁺

As contagens dos linfócitos TCD4⁺ foram realizadas através de citometria de fluxo na Seção de Imunologia do Laboratório Central do Estado (*FACS Count*[™] Reagents, Becton-Dickinson-San Jose Calif. USA) e na Seção de Imunotipagem do

Laboratório do Hospital de Clínicas da UFPR, utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados CD4/CD3 em solução tampão (*Becton-Dickinson Immunotech-Caxter San Jose Calif. USA*).

4.4 CULTURA, BACILOSCOPIA, SUBCULTIVO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICOBACTÉRIAS

Aos frascos de hemoculturas foi acrescentado 1 ml de caldo de enriquecimento para crescimento de micobactérias (composto por soro albumina bovina 14,5% P/V, cloreto de sódio 2,5% P/V, ácido oléico 0,174% v/v, saponina 4,4% em água purificada), logo após a coleta do sangue. Os frascos foram incubados no sistema *MB/BacT* por 42 dias a 37°C.

Amostras das hemoculturas, identificadas como positivas pelo sistema *BacT/Alert*, foram analisadas microscopicamente para visualização dos bacilos álcool-ácido-resistentes.

O método de coloração empregado para a baciloscopia foi de Zielhl-Gabbet, um método a frio, devido à dificuldade em fixar a amostra em lâmina, pelo método a quente (Ziehl-Neelsen). A técnica de Ziehl-Gabbet foi empregada segundo especificação da Reunião para Padronização dos Exames Baciloscópicos em Pacientes de Hanseníase (1986), como descrito a seguir: as lâminas foram imersas em fucsina de Gabbet por 20 minutos, lavadas em água corrente, evitando que o jato caísse sobre o esfregaço, em seguida imersa em azul de Gabbet por 3 minutos e novamente lavada em água corrente conforme descrito acima. Finalmente as lâminas foram secas ao ar livre ou em estufa a 36°C e examinadas ao microscópio para visualização de bacilos álcool-ácido resistentes.

Para a identificação das espécies de micobactérias, as amostras coletadas dos frascos de hemoculturas positivas no sistema *BacT/Alert* foram semeadas em meio de Löwenstein-Jensen. Após o crescimento bacteriano, foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: produção de niacina, redução de nitrato, catalase a 68°C, hidrólise do *tween* 80, urease, telurito de potássio e β -glicosidase (Figura 10). Foram também considerados para a identificação, o tempo de crescimento e a produção de pigmento (BRASIL, Manual de bacteriologia da tuberculose, 1994).

A incubação das amostras no Sistema *BacT/Alert*, a baciloscopia e o

subcultivo no meio de Löwestein-Jensen foram realizadas na Seção de Bacteriologia do Serviço de Análises Clínicas do Laboratório do Hospital de Clínicas da UFPR. As identificações bioquímicas das espécies de micobactérias foram realizadas na Seção de Bacteriologia, Serviço de Micobactérias do Laboratório Central do Estado). Todos os procedimentos foram realizados em Cabine de Segurança tipo II, com os equipamentos de proteção individuais adequados.

FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DA COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

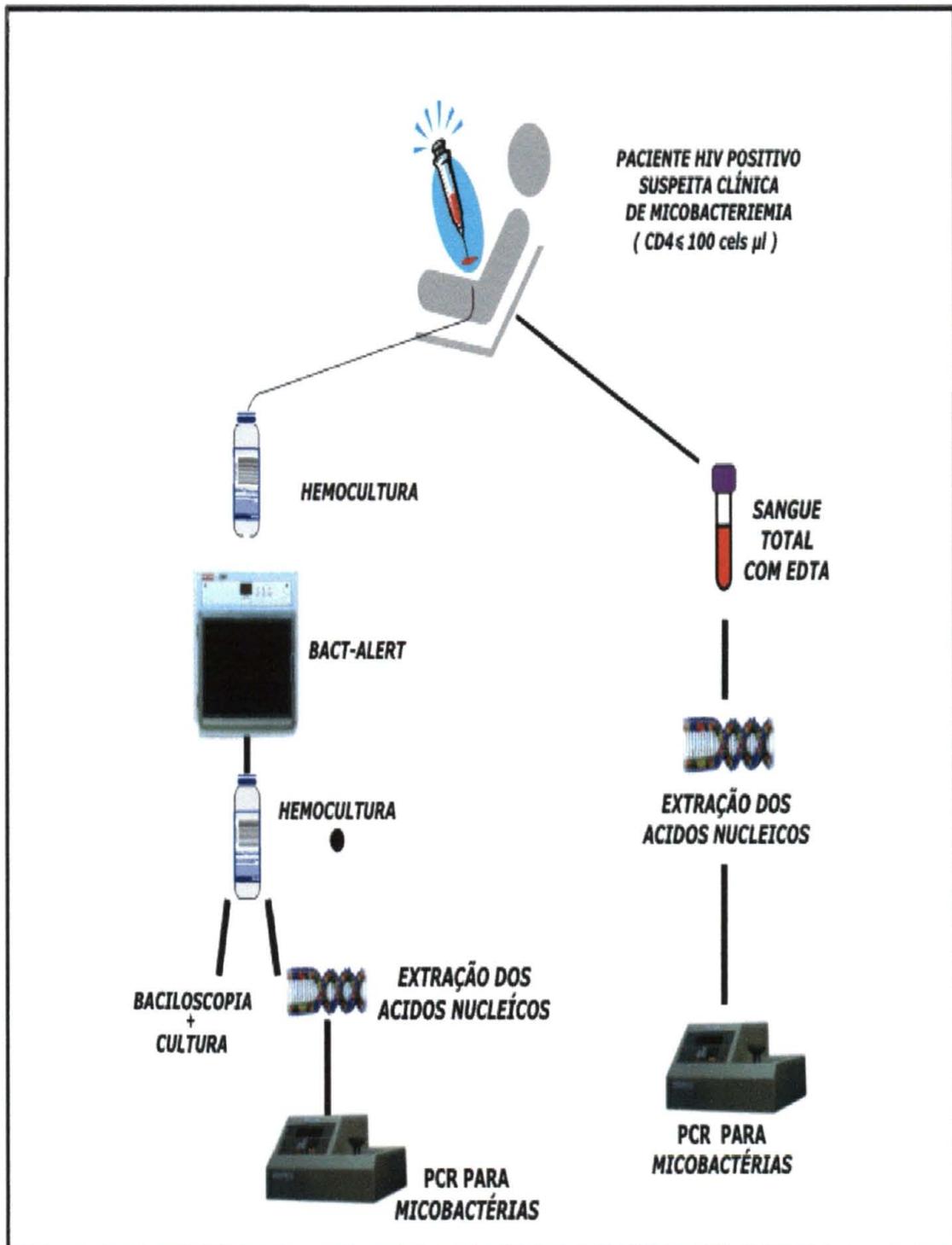
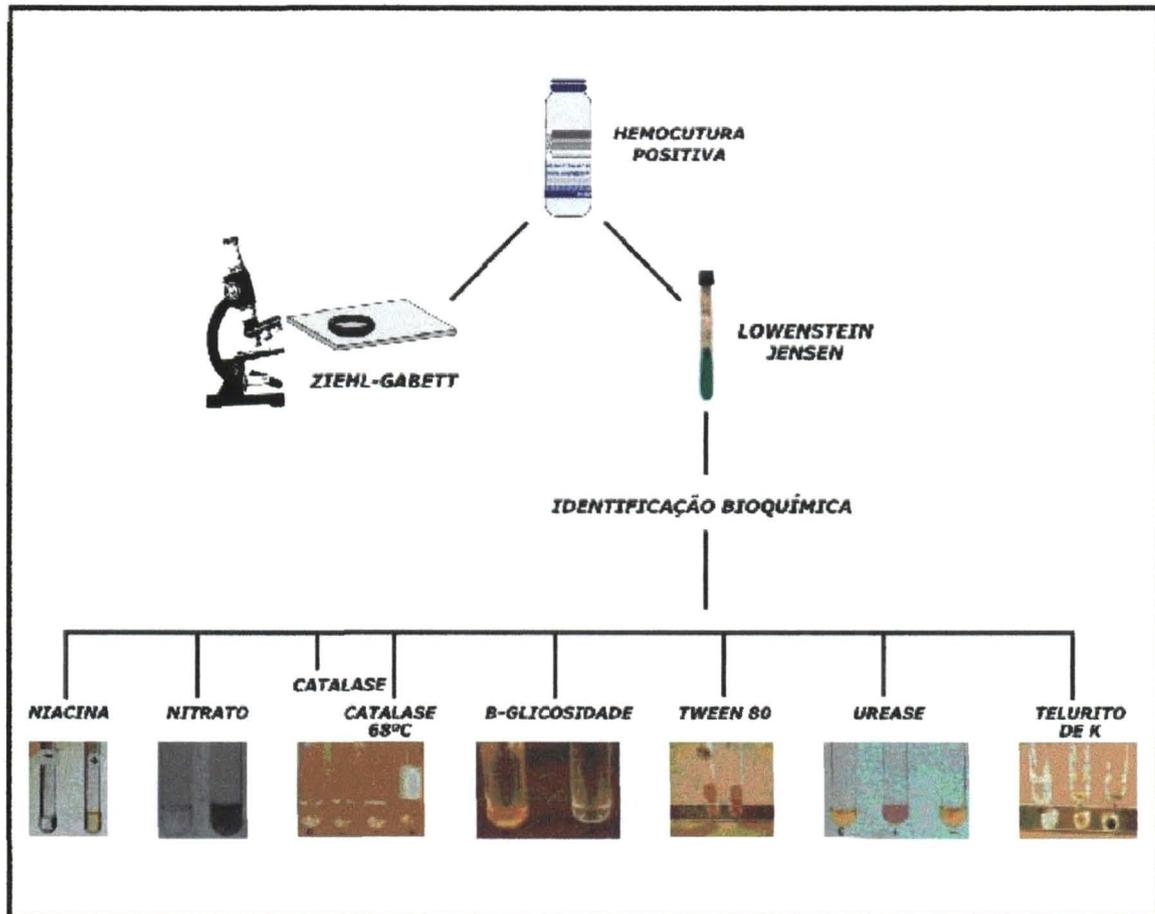


FIGURA 10 - IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS ATRAVÉS DE TESTES BIOQUÍMICOS



4.5 EXTRAÇÃO DO DNA

Foi também objetivo deste trabalho a escolha de um melhor método de extração do DNA das micobactérias das amostras de sangue e, principalmente dos frascos de hemoculturas positivas para micobactérias. Com esta finalidade os seguintes métodos de extração foram utilizados:

Método I - *Kit Genomic Prep Blood DNA Isolation*, os procedimentos foram realizados conforme instruções do fabricante. Os ácidos nucléicos foram extraídos a partir de 325 µl do sangue total utilizando os seguintes passos: 1-Lise das células 2-Precipitação das proteínas 3-Precipitação do DNA 4- Hidratação do DNA (Figura 11).

Método II - Método de Boom (*Kit Nuclisens Basic Nasba Diagnostic*) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, como se segue: os ácidos nucléicos foram extraídos a partir de 100 µl do sangue total e foram adicionados a 900µl do tampão de lise O (tiocianato de guanidina 5mol/L, triton X-100, Tris HCl, pH:7,4) ou tampão de lise R (tiocianato de guanidina 68%, 3% ditiotretitol, Tris-HCl, <1%glicogênio, pH:7,0). Os tampões de lise com as amostras, foram mantidos a temperatura de 4-8°C por 12 horas e incubados a 37°C por 30 minutos para dissolver os cristais formados. Adicionou-se 50µl de sílica, que serve como uma fase sólida onde os ácidos nucléicos ficarão aderidos. Realizou-se após os procedimentos de purificação com tampão de lavagem (tiocianato de guanidina 5mol/L e Tris/HCl), álcool 70% (Merck) e acetona P.A. Os ácidos nucléicos foram ressuspensos com tampão (Tris/HCl).

Método III - Método de Boom modificado consiste na realização do método II com a adição de mais um passo de lavagem com álcool benzílico PA^R (Merck). Este foi o método escolhido para a extração do DNA dos frascos de Hemocultura deste estudo (Figura 12).

Método IV - Extração Orgânica pelo Álcool Benzílico-Tiocianato de Guanidina, desenvolvido por FREDERICKS e RELMAN (1998), foi testado neste trabalho para a extração do DNA dos frascos de hemocultura. Em um tubo Eppendorf foram adicionados 100µl do conteúdo do frasco de hemocultura mais 100µl de tampão de lise (tiocianato de guanidina 5 mol/L, triton X-100, tris HCl, 400µl de água destilada, e 800µl de álcool benzílico 99% (Merck)). Após homogeneização, foi realizada centrifugação a 7000 g por 5 minutos. Um total de 400µl do sobrenadante aquoso foi

transferido para um novo tubo de Eppendorf, sendo adicionado 40µl de acetato de sódio 3M e 440µl de isopropanol. A amostra foi centrifugada a 16.000g por 15 min a 4°C. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e secado ao ar. O DNA foi ressuspenso com 100µl de tampão de eluição.

FIGURA 11 - PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO UTILIZANDO O KIT GENOMIC-PREP DNA ISOLATION (MÉTODO I)

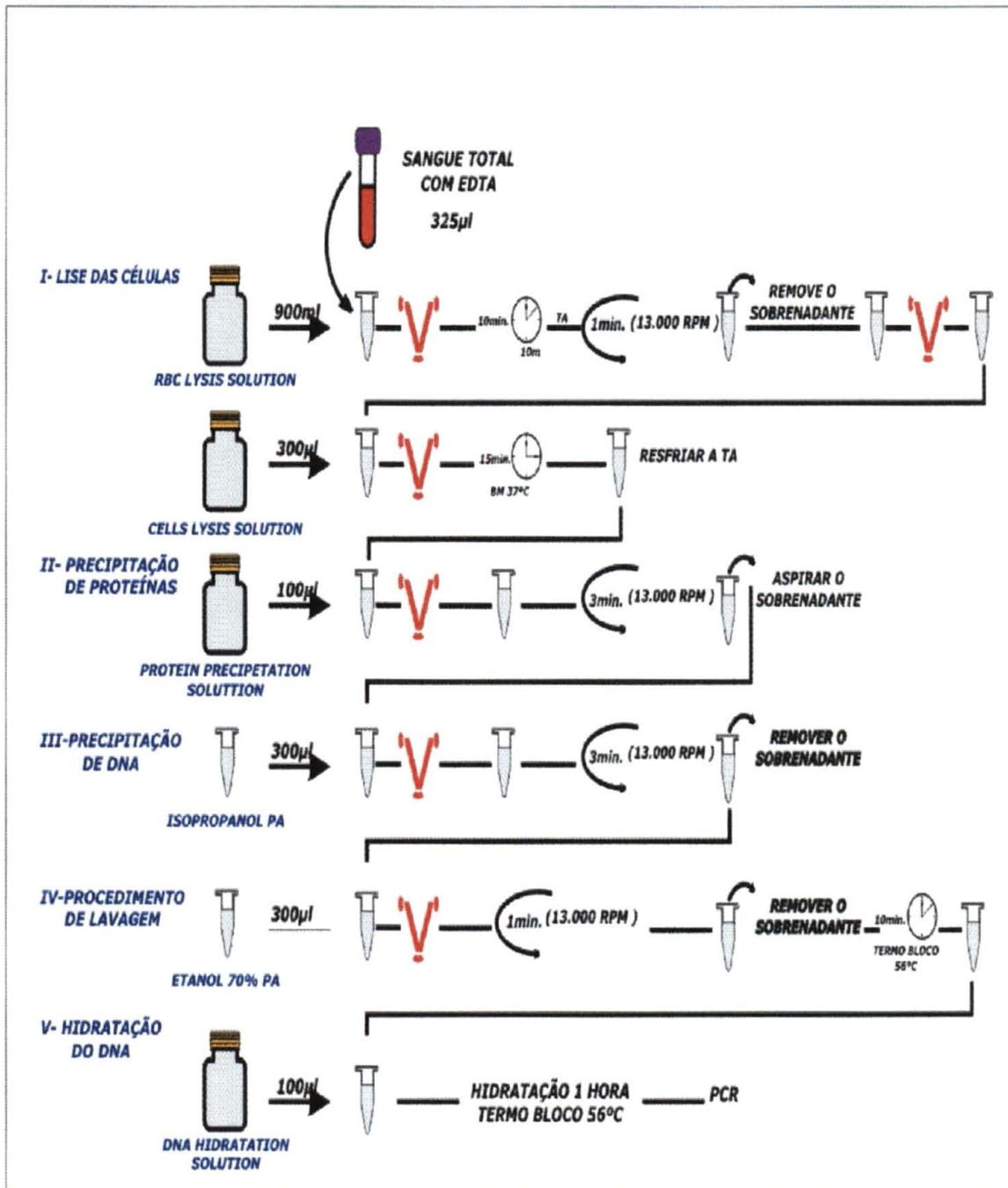
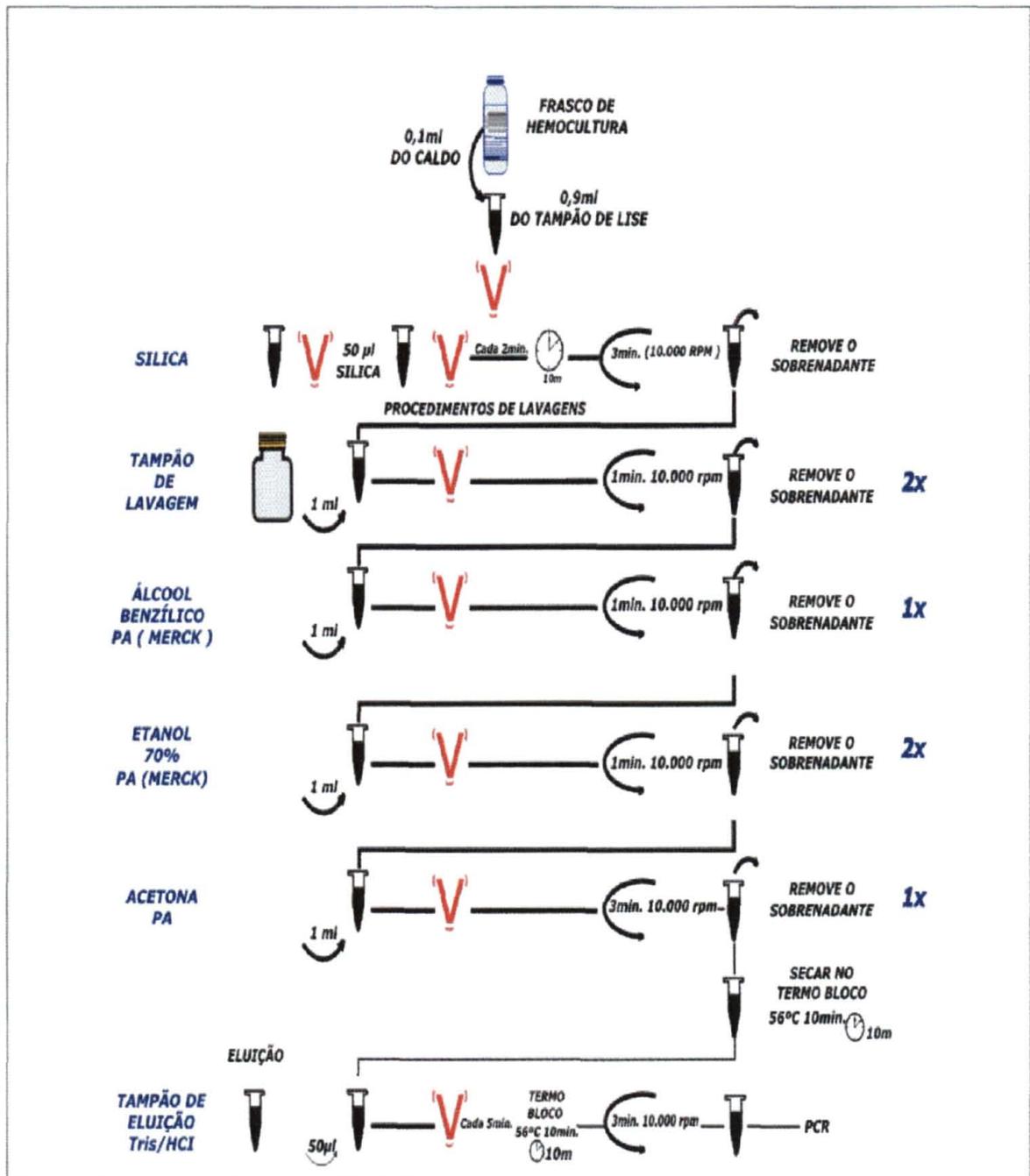


FIGURA 12 - PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS DE HEMOCULTURA UTILIZANDO O MÉTODO DE BOOM MODIFICADO (MÉTODO III)



4.6 LEITURA DAS CONCENTRAÇÕES DE DNA.

Para verificar analiticamente a concentração do DNA obtido através dos dois métodos de extração que ofereceram os melhores resultados (Boom e Boom modificado), foram realizadas leituras das amostras de DNA em biofotômetro Ultra Violeta (UV) 1101 WPA (Linton Cambridge, UK). As amostras foram diluídas 1:100 em água ultrapura (gibco-BRL®Life Technologies) e as leituras realizadas em 260 nm, utilizando-se cubetas de quartzo e o branco com água ultrapura (gibco-BRL®Life Technologies).

4.7 PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DA PCR.

Todos os procedimentos da PCR foram realizados na Seção de Biologia Molecular do Laboratório Central do Estado. Para evitar contaminação, todos os procedimentos (preparação do *master mix*, extração do DNA, amplificação e detecção) foram realizados em salas separadas. Os procedimentos referentes ao preparo do "*master mix*" e extração do DNA foram realizados em Cabines de Segurança tipo II, em suas respectivas salas. Para validar os resultados da PCR, todas as análises foram realizadas com controles negativos e positivos. Os controles positivos para micobactérias foram provenientes de culturas de Löwenstein-Jensen já identificadas bioquimicamente. As colônias foram adicionadas a tubos de Eppendorf contendo 500µl de soro fisiológico estéril, homogeneizadas e o DNA extraído através do choque térmico. O controle negativo utilizado foi água ultrapura mili-Q. Todos os "primers", assim como os demais componentes do *Master Mix* foram sintetizados pela gibco-BRL Life Technologies, São Paulo, Brasil. As amplificações foram realizadas no termociclador Perkin Elmer 9600 (Perkin Elmer, Cetus, Norwalk, EUA).

4.7.1 PCR do sangue periférico

A extração do DNA das amostras de sangue periférico foi realizada conforme o método I (*Kit Genomic Prep Blood DNA Isolation*). Foram realizadas PCR para o *M. avium*, o *M. tuberculosis* e para o gene da β -globina, conforme descritos nos itens 4.7.3, 4.7.6 e 4.7.8, respectivamente.

4.7.2 PCR do frasco de hemocultura

A extração do DNA das amostras obtidas dos frascos de hemoculturas foi realizada conforme o Método de Boom modificado. Foram realizadas PCR de todos os 80 frascos de hemocultura positivos e negativos para *M. avium* e *M. tuberculosis*, conforme descrito nos itens 4.7.3 e 4.7.6. Também as amostras que foram detectadas como positivas no sistema *BacT/alert*, porém com baciloscopia negativa foram testados por PCR. Foram também realizadas PCR para *Mycobacterium sp*, conforme o item 4.7.5 (TABELA 2).

TABELA 2 PCR REALIZADAS NO PRESENTE ESTUDO

AMOSTRAS	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium sp</i>	Beta-globina
Sangue Periférico (SP)	X	X		X
Hemocultura positiva	X	X		
Hemocultura Falso Positiva*	X	X	X	
Hemocultura Negativa	X	X		

NOTA: * Falso positiva: hemoculturas detectadas como positivas no sistema *BacT/alert* com baciloscopia negativa.

4.7.3 Amplificação da Região IS1245 para detecção do *M. avium* (Protocolo de HAAS)

A reação foi realizada em um volume total de 100 µl, sendo 10µl do tampão PCR concentrado 10X 200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl, 3µl de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50mM, 8µl de dNTPs (200mM), 10µl de cada "primer" (100pmol), 0,5µl de *Taq* DNA polimerase 2,5 Unidades e 10µl do DNA extraído. As amplificações foram realizadas no termociclador com 1 ciclo de 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94° C por 30 s, 60° C por 30s e 72° C por 1 min, 72°C por 10 min e 4°C indefinidamente.

Os "primers" utilizados na identificação do *M. avium* foram desenhados conforme trabalho de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Investigação de Micobactérias da Universidade de Heidelberg, Alemanha, coordenado pelo Prof. Dr. Walter HAAS, em 1997 (comunicação pessoal, dados não publicados). As seqüências destes "primers" são: noah-3 5'-ACT TCC TGC GCA ACG TGC T - 3' noah-5: 5'-ATG CCG GCG ATG GTG TCG-3' gerando um produto de amplificação de 140 pb. Esta PCR para *M. avium* foi realizada nas 80 amostras de sangue periférico e nos 80 frascos de hemocultura.

4.7.4 Amplificação da Região 16S rRNA para detecção do *M. avium*.

Para analisar a eficácia dos diferentes métodos de extração do DNA das hemoculturas, realizou-se a PCR para *M. avium* também com um par de "primers" da região 16S rRNA.

A reação foi realizada em um volume total de 100 µl, sendo 10µl do tampão PCR concentrado 10X (200mM tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl), 3µl de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50mM, 8µl de dNTPS (200mM), 10µl de cada primer 100pmol, 0,5µl de *Taq* DNA polimerase (2,5 Unidades) e 10µl DNA extraído. As amplificações foram realizadas no termociclador com 1 ciclo de 94°C por 10 min, 62°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 s, 62° C por 1 min, 72° C por 1 min. Após, um novo 1 ciclo de 94°C por 30 s, 62°C por 1 min, 72°C por 10 min e 4°C indefinidamente finalizou a reação de amplificação.

Os "primers" utilizados nesta detecção do *M. avium* foram sintetizados

como descritos por KULSKI et al. (1995). As seqüências destes "primers" são *mycav-R*: 5'-ACC AGA AGA CAT GCG TCT TG-3' e *mycgen-F*: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', com um produto de amplificação de 180pb. Esta PCR para *M. avium* foi realizada em todos os frascos de hemocultura positiva para *M. avium* pelo Protocolo de HAAS.

4.7.5 Amplificação da Região 16S rRNA para pesquisa de *Mycobacterium sp*

Para verificar a possível presença de outras micobactérias além do *M. tuberculosis* e do *M. avium* foram realizadas PCR para *Mycobacterium sp*, de todos os frascos de hemoculturas detectados como positivos no sistema *BacT/Alert* e com baciloscopia negativa.

A reação foi realizada em um volume total de 100 µl, sendo 10µl do tampão PCR concentrado 10X 200mM tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl, 3µl de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50mM, 8µl de dNTPS (200mM), 10µl de cada *primer* 100pmol, 0,5µl de *Taq* DNA polimerase (2,5 Unidades) e 10µl DNA extraído. As amplificações foram realizadas no termociclador com 1 ciclo de 94°C por 10 min, 62°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 62°C por 1 min, 72°C por 1 min. Após, um novo 1 ciclo de 94°C por 30 s, 62°C por 1 min, 72°C por 10 min e 4°C indefinidamente finalizou a reação de amplificação.

Os "primers" utilizados foram descritos por KULSKI, et al. (1995). As seqüências destes "primers" são *mycgen-R*: 5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3'. *mycgen-F*: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', com um produto de amplificação de 1030 pb.

4.7.6 Amplificação da Região IS 6110 para detecção de *M. tuberculosis*.

A reação foi realizada em um volume total de 100 µl, sendo 10µl do tampão PCR concentrado 10X (200mM tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl), 3µl de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50mM, 8µl de dNTPS (200mM), 10µl de cada primer 100pmol, 0,5µl de *Taq* DNA polimerase (2,5 Unidades) e 10µl DNA extraído. As

amplificações foram realizadas no termociclador Perkin Elmer 9600 com um ciclo de 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 30s, 68°C por 45s e 72°C por 1 min e 72°C por 7 min e 4°C indefinidamente.

OS "primers" utilizados na identificação do *M. tuberculosis*, foram desenhados conforme descrito por EISENACH et al. (1990). As seqüências destes "primers" são : IS-1: 5' -CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG-3' e IS-2:5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3' com um produto de amplificação de 123 pb. Esta PCR para *M. tuberculosis* foi realizada das 80 amostras de sangue periférico e dos 80 frascos de hemocultura positivos e negativos.

4.7.7 Detecção do *Mycobacterium tuberculosis* pelo Kit AMPLICOR (*Mycobacterium tuberculosis* - MTB - Test Roche).

Este protocolo foi utilizado para confirmar a pesquisa do *M. tuberculosis* em cinco amostras do sangue periférico que apresentaram hemocultura positiva para *M.tuberculosis* (n=5), porém detectadas como negativas pelo protocolo de EISENACH Os testes foram realizados conforme as instruções do fabricante, do Kit Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) Test roche (F. Hoffmann-La roche Ltd, Basel, Switzerland). A região do gene 16S rRNA do *M. tuberculosis* é a região alvo a ser amplificada com os "primers" biotinilados KY18 e KY75, gerando um produto de 584pb. As extrações do DNA das amostras de sangue foram realizadas de acordo com o Método I - *Kit Genomic prep DNA Blood Isolation*. Para a amplificação das amostras, 50µl do DNA extraído foram adicionados ao *master mix* (tampão tris-HCl, glicerol Taq DNA polimerase (<0.01%), dNTPs (<0.01%), "primers" KY18 e KY75 (0,05%), 100 µl de MYCO IC e 100µl de Amperase LD). A amplificação foi realizada no aparelho Perkin Elmer 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn) com os seguintes ciclos: 1 ciclo de 10 min 50°C; 2 ciclos de 20s 98°C, 20s 62°C, 45s 72°C; 41 ciclos de 20s 94°C, 20s 62°C, 45s 72°C; 1 ciclo de 5min 72°C (não exceder 24 horas). A detecção foi realizada pela técnica de enzima imunoensaio com um conjugado de avidina-peroxidase de cavalo e tetrametilbenzidina - dimetilamida. A reação foi finalizada com a adição de ácido sulfúrico 4.9%. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 450 nm. As amostras com valor de absorbância maior que 0.350 foram consideradas positivas.

4.7.8 Amplificação do gene da β -globina

Para excluir a possível presença de inibidores da PCR, a perda do DNA precipitados durante a extração ou ambos foi realizada a amplificação concomitante do gene da β -globina nas amostras de sangue periférico, como controle interno.

A reação foi realizada em um volume total de 100 μ l, sendo 10 μ l do tampão PCR concentrado 10X (200mM tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl), 3 μ l de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) 50mM, 8 μ l de dNTPS (200mM), 10 μ l de cada primer 100pmol, 0,5 μ l de *Taq* DNA polimerase (2,5 Unidades) e 10 μ l DNA extraído. As amplificações foram realizadas no termociclador com 1 ciclo de 94°C por 10 min, 62°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 62°C por 1 min, 72°C por 1 min. Após, um novo 1 ciclo de 94°C por 30 s, 62°C por 1 min, 72°C por 10 min e 4°C indefinidamente finalizou a reação de amplificação.

Os "primers" do gene da β -globina, foram descritos por KULSKI et al. (1995), cujas seqüências são: *rs* 42 5'-GCT CAC TCA GTG TGG CAA AG-3', e *km* 29 5'-GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G-3'. O produto de amplificação constituiu um fragmento de 536 pb.

Com o objetivo de verificar a presença do DNA da β - globinas nos frascos de hemocultura, após 40 dias de incubação no sistema *BacT/Alert*, foram coletados 5 ml de sangue total em duplicata, de pacientes soro negativos para o HIV e sem suspeita de micobacteriemia. O sangue foi adicionado ao frasco de hemocultura MB/ BacT nas mesmas condições dos testes, sendo incubado por 40 dias no sistema BacT/Alert. Foram retiradas amostras de 1,5 ml do frasco de hemocultura no tempo zero (imediatamente após a adição do sangue no frasco), 10 dias, 20 dias, 30 dias e 40 dias de incubação. Foi realizada a extração de DNA conforme o método de extração III (Método de Boom modificado) e realizada PCR para pesquisa do gene da β -globina .

4.8 DETECÇÃO E ANÁLISE DO PRODUTO DA PCR.

A detecção dos produtos das PCRs foi feita através de eletroforese em gel de agarose tipo II eletroendosmose 0.09-0.13 mm 1,5% (Gibco BRL® *Life Technologies*), sendo corado com brometo de etídeo numa concentração final de 0,5µg/ml em tampão TBE (tris-borato EDTA). Para cada poço do gel de agarose foram colocadas as respectivas amostras com 10µl do DNA amplificado com 2µl de corante azul de bromofenol 0,2% e o marcador de peso molecular foi preparado da seguinte forma: 4µl do marcador de peso molecular, 6µl de água milli-Q e 2µl do corante azul de bromofenol. A eletroforese foi corrida a 170 volts, por 30 minutos.

A visualização das bandas foi realizada em um transiluminador ultravioleta (Uniscience, Brasil). Foi utilizado como marcador de peso molecular o *DNA ladder* 100pb com bandas de 100-200-300-400-500-600-700-800 pb (*gibco-BRL®, Life Technologies*). A visualização de bandas correspondentes aos respectivos fragmentos amplificados que possuíam o tamanho esperado e igual ao controle positivo foi critério para diagnosticar os resultados da PCR das amostras. A fotodocumentação foi realizada através de câmara digital (*Kodak Digital Science – Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120 Rochester, NY USA*).

5 RESULTADOS

5.1 HEMOCULTURAS

Das 80 amostras analisadas, 12 hemoculturas foram positivas para micobactérias (15%), sendo que em 7 amostras foi identificado o *M. avium* e em 5 amostras o *M. tuberculosis*. As hemoculturas foram detectadas como positivas pelo sistema *BacT/Alert* em média após 9,5 dias de incubação para *M. avium*, enquanto que as hemoculturas positivas para *M. tuberculosis* levaram em média 16,7 dias (Tabela 3). Todas as 12 hemoculturas positivas foram confirmadas através da baciloscopia de Ziehl-Gabbet e cultura em meio sólido de Löwenstein-Jensen, com as devidas identificações bioquímicas como descrito no item 4.3. Duas hemoculturas (2,5%) foram positivas para *Cryptococcus* sp e uma hemocultura (1,25%) foi positiva para *Candida* sp.

TABELA 3: TEMPO DE DETECÇÃO (EM DIAS) DAS HEMOCULTURAS POSITIVAS PARA *M. avium* E *M. tuberculosis* ATRAVÉS DO SISTEMA *BacT/Alert*

Micobactéria isolada	Hemocultura (Identificação)	Tempo (dias)
<i>M. avium</i>	583	4
	513	5
	505	9,2
	539	9,3
	582	10
	521	14
	515	15
<i>M. tuberculosis</i>	519	11,3
	569	14,8
	522	16,5
	541	18
	509	23,3

Oito hemoculturas (10%) foram consideradas falso positivas, pois apesar de terem sido detectadas positivas pelo sistema *BacT/Alert*, todas apresentavam baciloscopia (Ziehl-Gabbet) negativa. Os frascos destas hemoculturas foram reincubadas a 37°C em estufa comum e submetidos à baciloscopia por Ziehl-Gabbet semanalmente. Estas amostras foram então confirmadas como negativas, posteriormente, pela cultura em meio sólido de Löwenstein-Jensen e por PCR. Nestas hemoculturas falso-positivas foi realizada PCR para *M. avium*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium* sp, com resultado negativo para todas as oito amostras.

5.2 CONTAGEM DE LINFÓCITOS TCD4⁺.

Setenta e quatro pacientes (92,5%) apresentavam contagem de linfócitos T CD4⁺ ≤ 100 cel/μl e seis pacientes (7,5%) apresentavam contagem de linfócitos CD4⁺ > 100 cel/μl em ordem crescente : 104, 108, 112, 116, 125 e 311 cel/μl (Gráfico 2).

A bacteriemia por *M. avium* foi detectada em pacientes com contagem de linfócitos TCD4⁺ ≥ 7 cel/μl, sendo a média de 48,5 cel/μl; enquanto que a bacteriemia por *M. tuberculosis* foi detectada em pacientes com contagem de linfócitos TCD4⁺ ≥ 50 cel/μl, com média de 80 cel/μl (Tabela 4).

GRÁFICO 2: FREQUÊNCIA DE PACIENTES COM SIDA E SUSPEITA DE MICOBACTERIEMIA EM RELAÇÃO A CONTAGEM DOS LINFÓCITOS CD4⁺

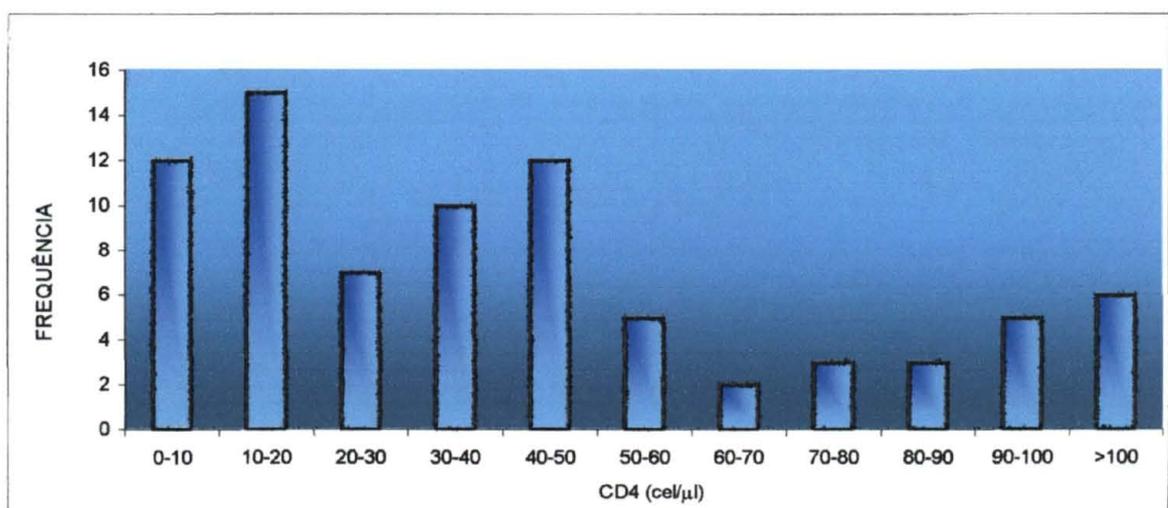


TABELA 4: CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM MICOBACTERIEMIA QUANTO À IDADE, SEXO, CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E MICOBACTÉRIA IDENTIFICADA.

IDENTIFICAÇÃO AMOSTRAS	IDADE (anos)	SEXO	Nº LINFÓCITOS TCD4 ⁺ cels/ μ L	MICOBACTÉRIA IDENTIFICADA
515	34	M	7	<i>M. avium</i>
583	46	F	25	<i>M. avium</i>
539	41	M	34	<i>M. avium</i>
505	39	F	38	<i>M. avium</i>
513	12	F	82	<i>M. avium</i>
582	31	M	112	<i>M. avium</i>
521	40	M	311	<i>M. avium</i>
519	23	F	50	<i>M. tuberculosis</i>
522	33	M	55	<i>M. tuberculosis</i>
509	32	M	94	<i>M. tuberculosis</i>
541	25	F	95	<i>M. tuberculosis</i>
569	27	M	108	<i>M. tuberculosis</i>

5.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE HEMOCULTURAS MB/BACT

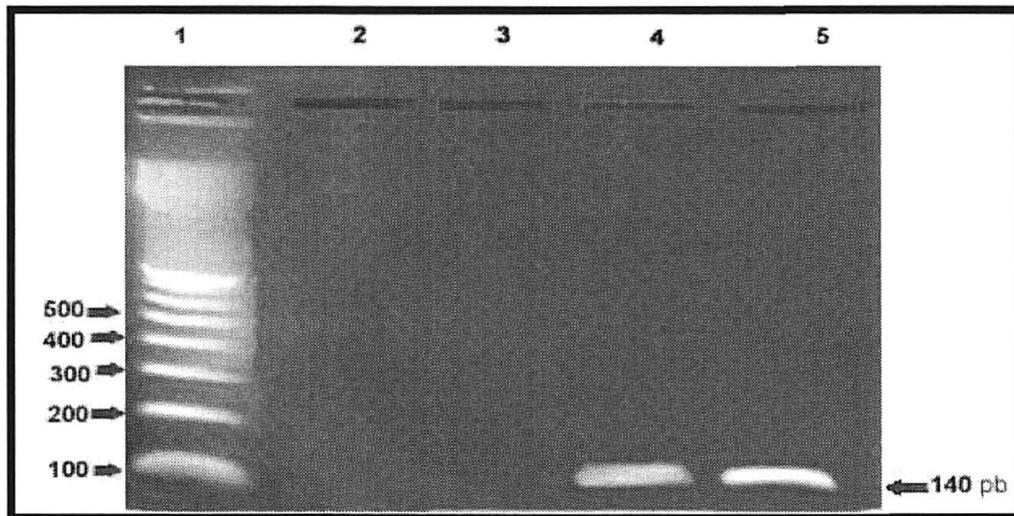
Foi também objetivo deste trabalho a escolha do melhor método de extração do DNA a partir dos frascos positivos de hemocultura MB/Bact .

Inicialmente utilizou-se o *Kit Genomic Prep Blood DNA Isolation (Amersham Pharmacia Biotech)*. Após a realização da PCR, não foi visualizada nenhuma banda nos frascos positivos para micobactérias (Figura 13). O segundo método de extração testado foi baseado na descrição de FREDERICKS e RELMAN (1998), que utilizaram a extração orgânica pelo álcool benzílico em frascos de hemocultura (BacT/alert anaerobic media: Organon Teknika). A utilização deste método na extração do DNA das micobactérias também não foi satisfatória (Figura 13).

Quando se utilizou o método de Boom a amplificação ocorreu, mas sem uma boa reprodutibilidade, algumas amostras apresentaram amplificação adequada, contudo em outras amostras as bandas foram fracas ou negativas (Figura 14). Apesar disto, o método II (Método de Boom) apresentou melhores resultados, quando comparado com os outros dois métodos acima descritos.

Na tentativa de melhorar a extração e purificação do DNA a partir do método de Boom, adicionou-se a este mais um passo de lavagem com o álcool benzílico, conforme descrito por FREDERICKS e RELMAN (1998). Este método foi designado de método de Boom modificado e se apresentou como a melhor técnica para a extração do DNA das micobactérias a partir dos frascos de hemocultura MB/BACT, ocorrendo a amplificação em 100% dos frascos positivos de hemocultura. O método de Boom modificado se apresentou com bandas de amplificação maiores quando comparadas com o método de Boom utilizando tampão de lise (R) nas mesmas amostras (Figura 15). O método de Boom modificado não apresentou diferença nas bandas amplificadas, mesmo utilizando diferentes tampões. Enquanto que o método de Boom apresentou diferenças na amplificação dependendo do tampão utilizado. O tampão R apresentou qualidade superior das bandas amplificadas em relação ao tampão O, onde muitas amostras não foram amplificadas quando se utilizou este último tampão (Figuras 16).

FIGURA 13 - PCR POSITIVA PARA *M. avium* DE HEMOCULTURA (MB/BACT) COMPARANDO OS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

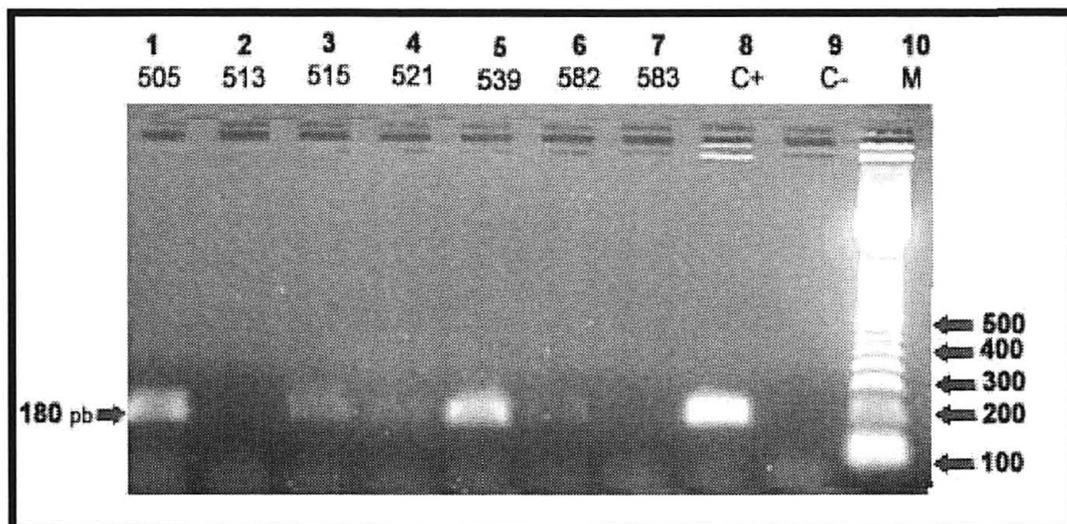


- 1 - Marcador de Peso Molecular 100 bp (gibco-BRL®, Life Technologies)
- 2 - Extração pelo Kit Genomic Prep (Amersham Pharmacia Biotech)
- 3 - Extração orgânica pelo álcool benzílico-tiocianato de guanidina
- 4 - Extração pelo Método de Boom modificado
- 5 - Controle Positivo

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para *M. avium* realizada segundo Protocolo de KULSKI (1995).

FIGURA 14 - PCR POSITIVAS PARA *M. avium* DE HEMOCULTURAS (MB/BACT) UTILIZANDO O MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA DESCRITO POR BOOM.

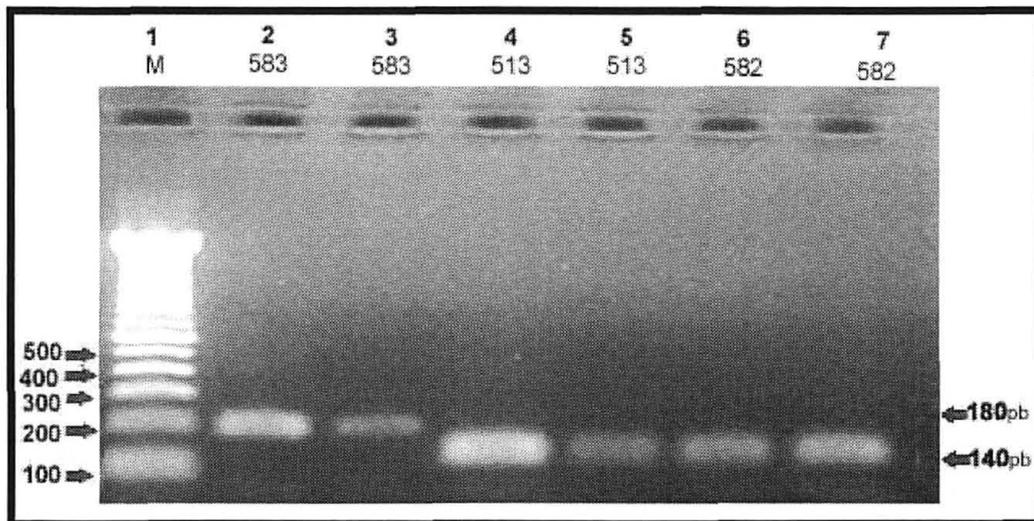


- 1 e 5 - PCR positiva
- 3,4 e 6 - PCR fracamente positiva
- 2 e 7 - PCR negativa (bandas ausentes)
- 8 - controle positivo de cultura de *M. avium*
- 9 - controle negativo
- 10 - Marcador de peso molecular 100 bp (Gibco-BRL®, Life Technologies).

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para *M. avium*, realizada segundo Protocolo de KULSKI (1995)

FIGURA 15 - PCR POSITIVAS PARA *M. avium* DE HEMOCULTURAS (MB/BACT) UTILIZANDO OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BOOM E BOOM MODIFICADO (TAMPÃO DE LISE R)

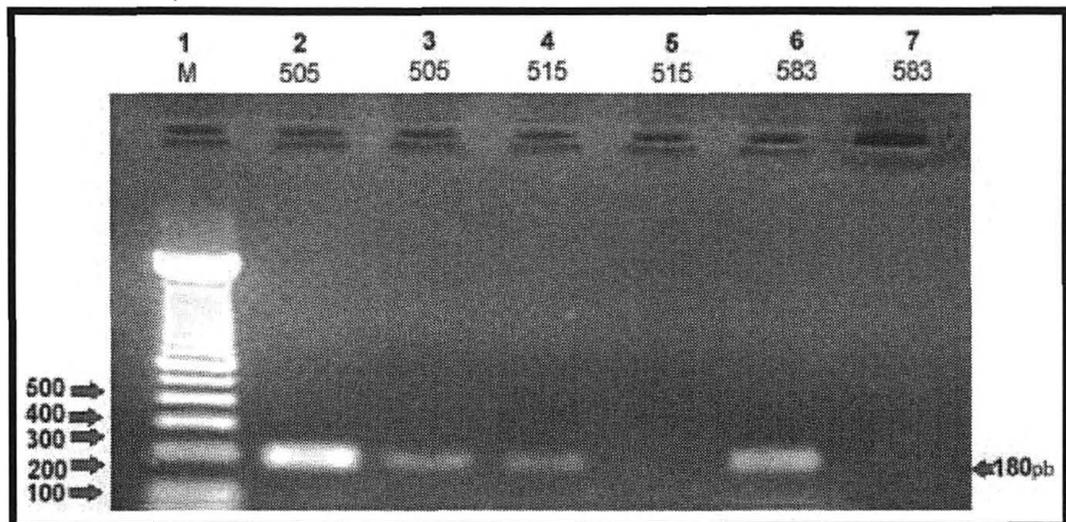


- 1- Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-brl®,Life Technologies)
- 2,4 e 6 - PCR positiva utilizando o Método de Extração de Boom modificado
- 3, 5 e 7 - PCR positiva utilizando o Método de Extração de Boom

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para *M. avium*, realizada segundo Protocolo de KULSKI,(1995), as demais segundo HAAS, (1997).

FIGURA 16 - PCR POSITIVAS PARA *M. avium* DE HEMOCULTURAS (MB/BACT) UTILIZANDO OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BOOM E BOOM MODIFICADO (TAMPÃO DE LISE O)



- 1- Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-brl®,Life Technologies)
- 2, 4 e 6 - PCR positiva utilizando o Método de extração Boom modificado
- 3 - PCR positiva utilizando o Método de extração Boom
- 5 e 7 - PCR negativa utilizando o Método de extração de Boom

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para *M. Avium* segundo Protocolo de KULSKI (1995).

5.4 LEITURA DAS CONCENTRAÇÕES DE DNA

Em sete amostras de hemoculturas positivas foi realizada a medida da concentração de DNA obtida através de dois métodos de extração (Boom e Boom modificado). A média da concentração de DNA obtida através do método de Boom modificado foi 356 µg/ml, sendo esta significativamente maior do que a concentração do DNA obtida pelo método de Boom, com média de 54 µg/ml ($p=0,027$ utilizando o teste t de "Student").

5.5 PCR DAS AMOSTRAS DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)

Após ter padronizado o melhor método de extração do DNA a partir dos frascos de hemocultura (método de Boom modificado ou método III) obteve-se 100% de positividade para as PCRs realizadas das amostras dos frascos de hemoculturas positivas. Dentre as 80 hemoculturas analisadas, 12 amostras foram positivas, sendo que em 7 amostras a PCR foi positiva para *M. avium* e em 5 amostras a PCR foi positiva para *M. tuberculosis*. A PCR portanto correlacionou-se 100% com a cultura. A prevalência de micobactérias observada foi de 15% sendo 8,8% para *M. avium* e 6,2% para *M. tuberculosis*. A sensibilidade e a especificidade da PCR para detecção de *M. avium* e *M. tuberculosis* a partir dos frascos de hemoculturas foram ambas de 100% (Tabelas 5 e 6). Nenhuma das amostras foi positiva concomitantemente para *M. tuberculosis* e *M. avium*. Nas figuras 19 e 20 são apresentados os resultados da PCR para *M. avium* e *M. tuberculosis* das amostras positivas para *M. avium*. Nas figuras 21 e 22 estão demonstrados os resultados das PCR positivas para *M. tuberculosis*.

TABELA 5: TAXA DE ACURÁCIA DA PCR PARA DETECÇÃO DE *M. tuberculosis* E *M. avium* DE FRASCOS DE HEMOCULTURA E SANGUE PERIFÉRICO EM RELAÇÃO AO ISOLAMENTO EM CULTURA

RESULTADOS	PCR para <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. avium</i> da hemocultura Mb/Bact	PCR Para <i>M. tuberculosis</i> do sangue periférico	PCR para <i>M. avium</i> do sangue periférico
Verdadeiro negativo	68	75	73
Verdadeiro positivo	12	0	3
Falso negativo	0	5	4
Falso positivo	0	0	0
Total	80	80	80

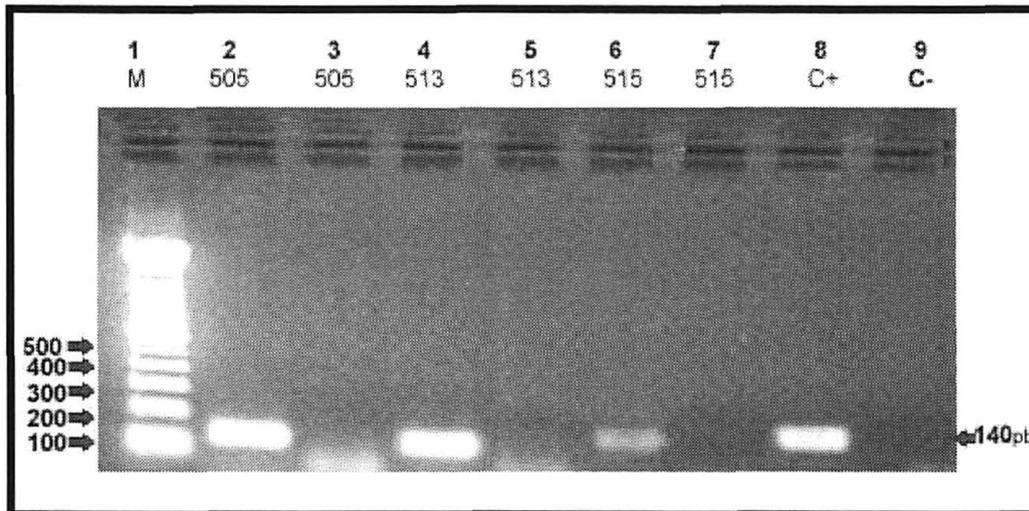
NOTA: Resultados obtidos quando comparados com cultura em meio de Löwenstein-Jensen

TABELA 6: SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, PREVALÊNCIA E TAXA DE ERRO FALSO POSITIVO E FALSO NEGATIVO DA PCR PARA *M. tuberculosis* E *M. avium* DE FRASCOS DE HEMOCULTURA E SANGUE PERIFÉRICO EM RELAÇÃO AO ISOLAMENTO EM CULTURA

VARIÁVEIS	PCR para <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. avium</i> da hemocultura* MB/BACT	PCR para <i>M. tuberculosis</i> * sangue periférico	PCR para <i>M. avium</i> * sangue periférico
Sensibilidade (S)	100,0	0,0	42,9
Especificidade (e)	100,0	0,0	100,0
Prevalência (P)	15,0	6,2	8,8
Taxa de erro falso positivo (TEFP)	0,0	0,0	0,0
Taxa de erro falso negativo (TEFN)	0,0	100,0	57,1

NOTA: * Resultados obtidos quando comparados com cultura em meio de Löwenstein-Jensen

FIGURA 17 – PCR POSITIVA PARA *M. avium* E NEGATIVA PARA *M. tuberculosis* DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)

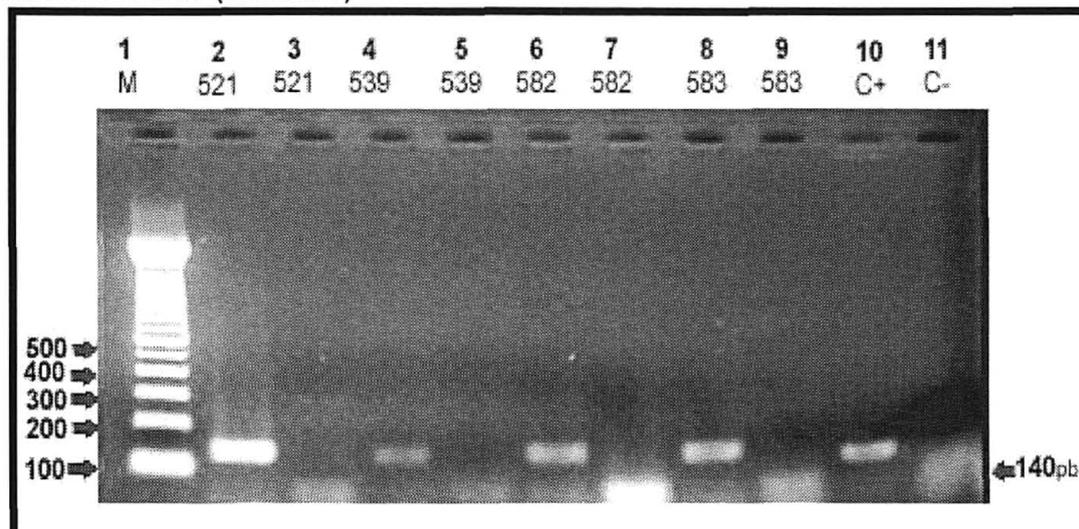


- 1 - Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-BRL®, *Life Technologies*)
- 2, 4 e 6 - PCR positiva para *M. avium*
- 3, 5 e 7 - PCR negativa para *M. tubérculos*
- 8 - controle positivo para *M. avium*
- 9 - controle negativo

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para *M. avium* segundo Protocolo de HAAS (1997) e para *M. tuberculosis* segundo Protocolo de EISENACH (1990)

FIGURA 18 – PCR POSITIVA PARA *M. avium* E NEGATIVA *M. tuberculosis* DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)

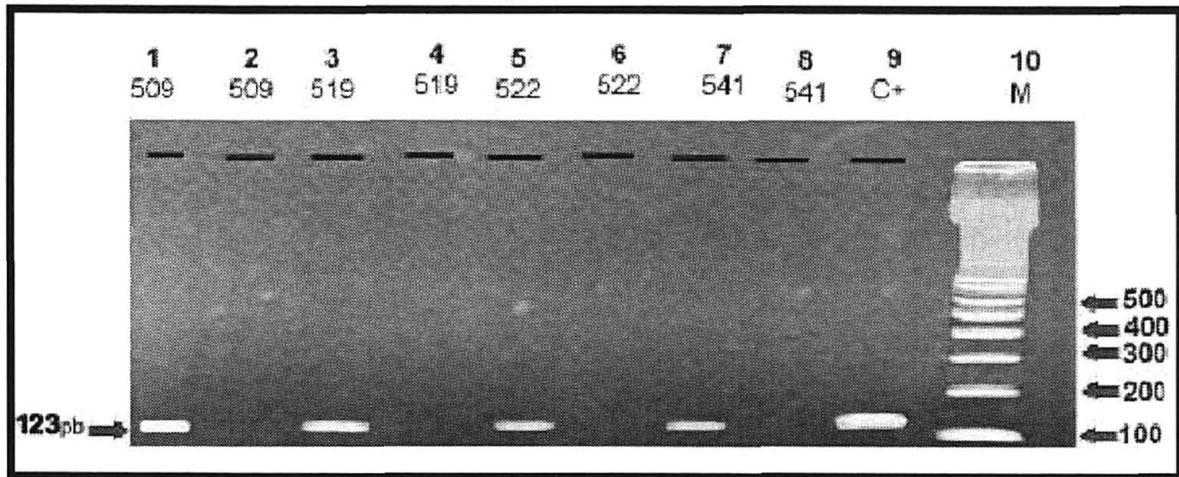


- 1 - Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-BRL®, *Life Technologies*)
- 2, 4, 6 e 8 -PCR positiva para *M. avium* (fragmento 140pb)
- 3, 5, 7 - PCR negativas para *M. tuberculosis*
- 10 -controle positivo para *M. avium*
- 11 - controle negativo.

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para *M. avium* segundo Protocolo de HAAS (1997) e para *M. tuberculosis* segundo Protocolo de EISENACH (1990)

FIGURA 19 – PCR PARA POSITIVA *M. tuberculosis* E NEGATIVA PARA *M. avium* DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)

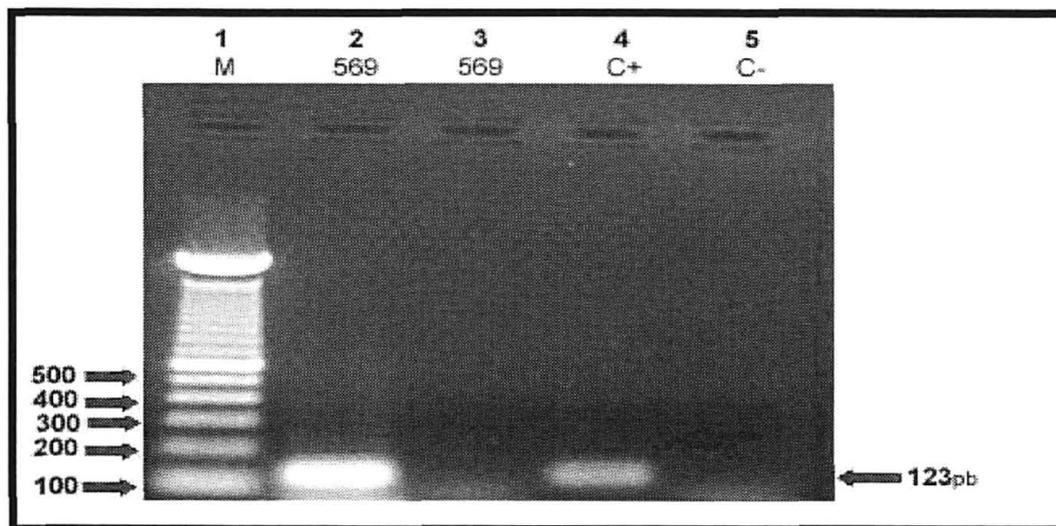


- 1, 3, 5 e 7- PCR positiva para *M. tuberculosis* (fragmento 123pb)
- 2, 4, 6 e 8 - PCR negativas para *M. avium*
- 9 - controle positivo para *M. tuberculosis*
- 10 - Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-BRL®, Life Technologies)

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para *M. avium* segundo Protocolo de HAAS (1997) e para *M. tuberculosis* segundo Protocolo de EISENACH (1990)

FIGURA 20 – PCR POSITIVA PARA *M. tuberculosis* E NEGATIVA PARA *M. avium* DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)



- 1 - Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-BRL®, Life Technologies)
- 2 - PCR positiva para *M. tuberculosis* (fragmento 123pb)
- 3 - PCR negativa para *M. avium*
- 4 - controle positivo para *M. tuberculosis*
- 5 - controle negativo.

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para *M. avium* segundo Protocolo de HAAS (1997) e para *M. tuberculosis* segundo Protocolo de EISENACH (1990)

5.6 PCR PARA *M. avium* DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO

Das oitenta amostras de sangue periférico testados por PCR para detecção de *M. avium*, somente três apresentaram-se como positivas. Portanto das 7 amostras positivas para *M. avium* nas hemoculturas, somente 3 foram positivas na PCR do sangue periférico, sendo 4 amostras falso-negativas (Figuras 21 e 22). A sensibilidade e a especificidade da PCR realizada diretamente do sangue periférico foi de 42,9% e 100% respectivamente (Tabelas 5 e 6)

Nas figuras 23 e 24 são apresentados os resultados das eletroforeses gel das PCRs obtidas dos frascos de hemocultura positiva e do sangue periférico para *M. avium*.

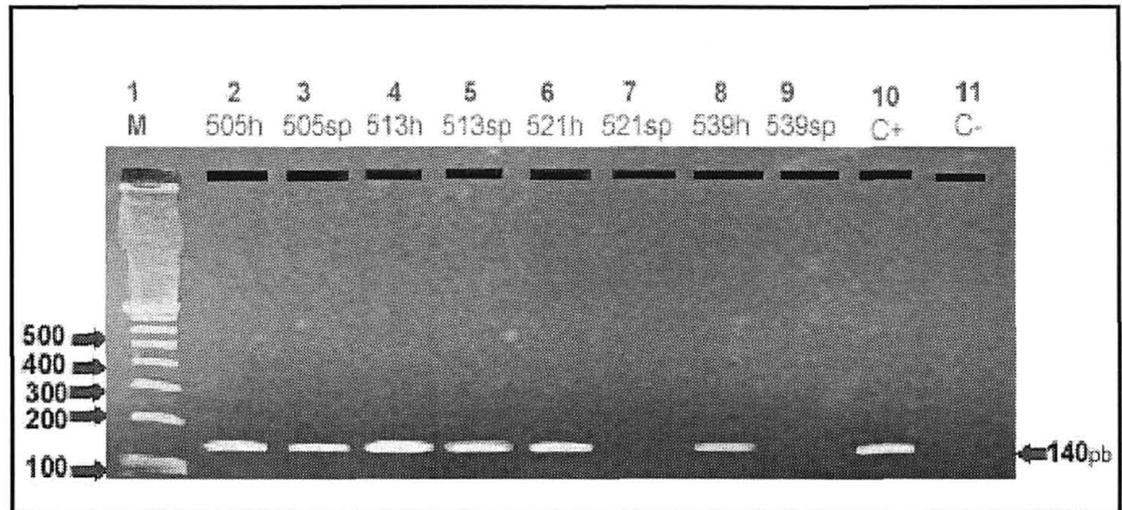
5.7 PCR PARA *M. tuberculosis* DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO

Das oitenta amostras de sangue periférico testadas por PCR para detecção de *M. tuberculosis* nenhuma se mostrou positiva. Portanto as 5 amostras positivas para *Mycobacterium tuberculosis* nas hemoculturas foram negativas para a PCR, quando esta foi realizada diretamente em amostras do sangue periférico. Cinco amostras de sangue deram resultados falso-negativos (Tabelas 5 e 6). Nas figuras 23 e 24 são apresentados os resultados das eletroforeses da PCR realizada para *M. tuberculosis* dos frascos de hemoculturas positivas e do sangue periférico.

Para confirmar estes resultados, estas mesmas amostras foram submetidas em paralelo a outro método de PCR (Kit Amplicor® *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) *Test Roche*). Todas as amostras testadas apresentaram uma absorbância inferior a 0.350 e foram consideradas negativas (Figura 25).

Os resultados obtidos confirmaram que as amostras de sangue testadas foram negativas para a presença de DNA do *Mycobacterium tuberculosis*.

FIGURA 21 - PCR PARA *M. avium* DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA MB/BACT (h) E DO SANGUE PERIFÉRICO (sp)

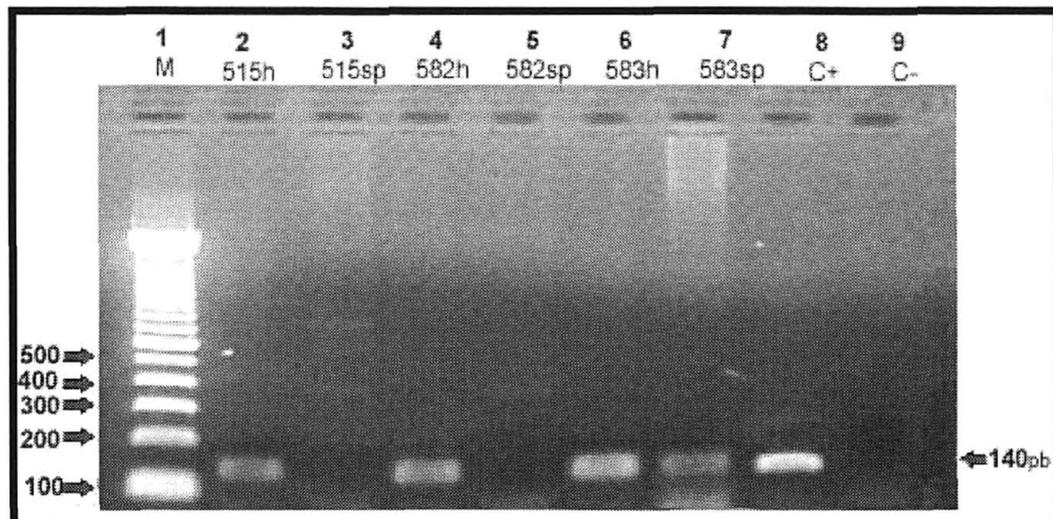


- 1- Marcador de peso molecular 100 Bp (Gibco-BRL®.Life Technologies)
- 2, 4, 6 e 8 - PCR positiva para *M. avium* das hemoculturas
- 3 e 5 - PCR positiva para *M. avium* do sangue periférico
- 7 e 9 - PCR negativa para *M. avium* do sangue periférico
- 10 - controle positivo para *M. avium*
- 11 - controle negativo

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR PARA *M. avium* SEGUNDO PROTOCOLO DE HAAS (1997)

FIGURA 22 – PCR PARA *M. avium* DOS FRACOS DE HEMOCULTURA MB/BACT (h) E DO SANGUE PERIFÉRICO (sp)

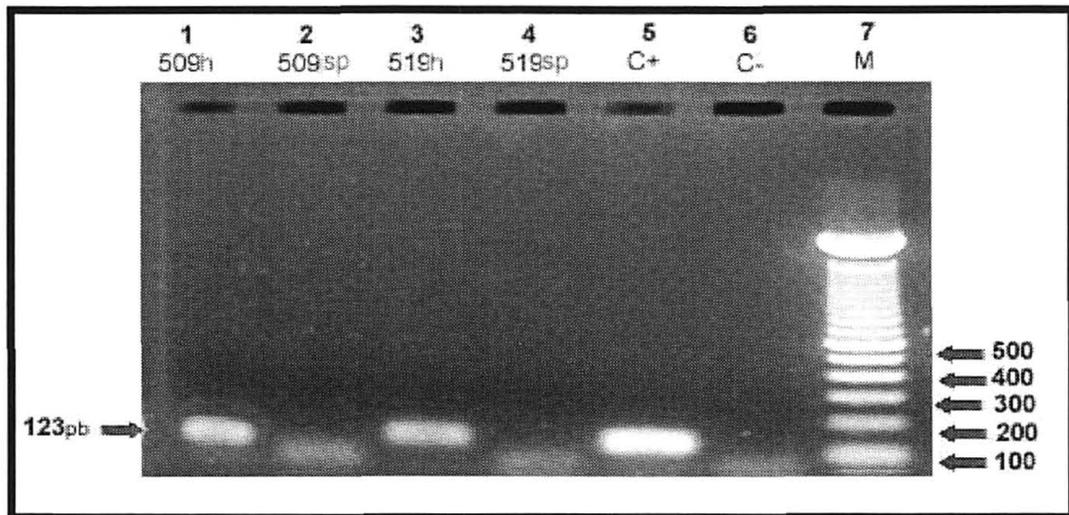


- 1- Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-BRL®.Life Technologies)
- 2, 4 e 6 - PCR positiva para *M. avium* da hemocultura
- 3 e 5 - PCR negativa para *M. avium* nos sangue periférico
- 7- PCR positiva para *M. avium* do sangue periférico
- 8 -controle positivo para *M. avium*
- 9 - controle negativo.

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

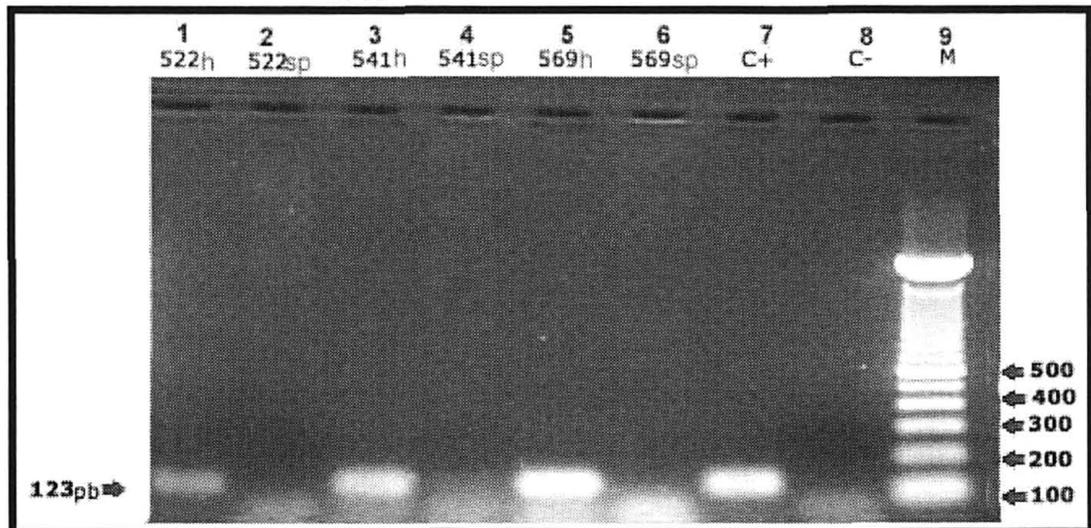
PCR para *M. avium* segundo Protocolo de HAAS (1997)

FIGURA 23 - PCR PARA *M. tuberculosis* DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA MB/BACT (h) E DO SANGUE PERIFÉRICO (sp)



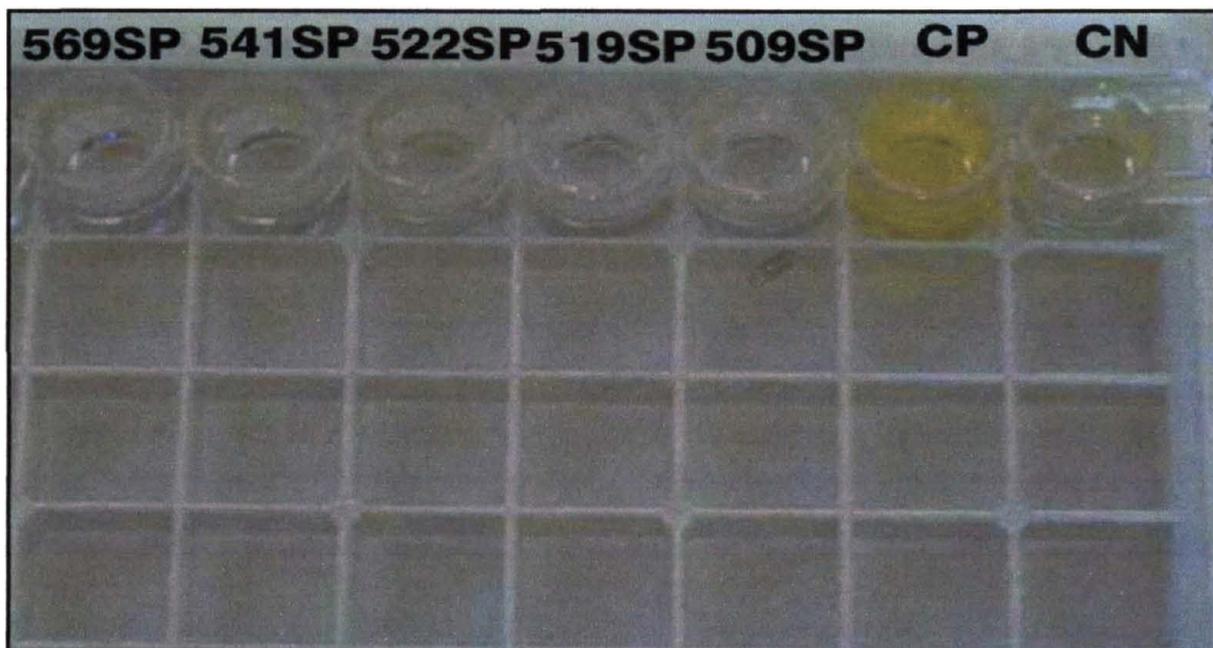
1, 3 PCR - positiva *M. tuberculosis* dos frascos de hemocultura
 2 e 4 - PCR negativa para *M. tuberculosis* do sangue periférico;
 5 - controle positivo para *M. tuberculosis*
 6 - controle negativo
 7 - Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-BRL®, *Life Technologies*)
 NOTA: : Eletroforese em gel de agarose 1,5%
 PCR para *M. tuberculosis* segundo Protocolo de EISENACH (1990)

FIGURA 24 - PCR PARA *M. tuberculosis* DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA MB/BACT (h) E DO SANGUE PERIFÉRICO (sp)



1, 3 e 5 -PCR positiva para *M. tuberculosis* dos frascos de hemocultura
 2, 4 e 6 - PCR negativa para *M. tuberculosis* de amostras de sangue periférico
 7- controle positivo para *M. tuberculosis*
 8 -controle negativo
 9 - Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-BRL®*Life Technologies*)
 NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%
 PCR para *M. tuberculosis* segundo Protocolo de EISENACH (1990)

FIGURA 25 – RESULTADO DA PCR PARA *M. tuberculosis* DAS AMOSTRAS DO SANGUE PERIFÉRICO, QUE TIVERAM HEMOCULTURA POSITIVA, UTILIZANDO O KIT AMPLICOR MTB - ROCHE - DETECÇÃO POR ELISA



SP- sangue periférico; CP- controle positivo; CN- controle negativo.
 absorbâncias observadas: controle negativo: 0.02; controle positivo:0.572;
 amostra 509:0.024; amostra519:0.017; amostra 522:0.018; amostra 541:0.043; amostra 569:0.034

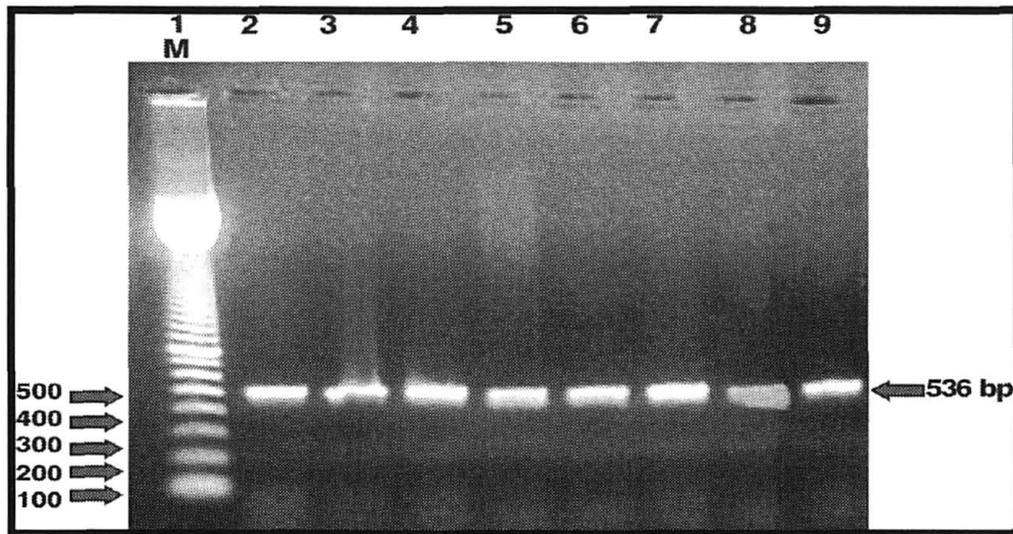
5.8 PCR PARA β -GLOBINA

Todas as PCRs do sangue periférico foram realizadas utilizando-se também os “*primers*” específicos para o gene da β -globina, a fim de verificar se houve ou não perda de DNA nos procedimentos de extração ou inibição da reação de amplificação das amostras. Os resultados demonstraram uma boa resolução, com a presença do gene da β -globina em todas as amostras testadas, não havendo perda do DNA nem inibições da reação da PCR nas amostras de sangue periférico (Figura 26).

A PCR para o gene da β -globina foi também realizada nas amostras dos frascos de hemoculturas negativas como controle interno para verificar se não houve perda do DNA extraído. Contudo, após várias tentativas frustradas, foram realizados experimentos para verificar a possível perda de integridade do DNA da β -globina nas amostras de hemoculturas incubadas por períodos longos. Os resultados destes

frascos de hemocultura MB/BacT. após 40 dias de incubação no sistema BacT/Alert. A PCR do gene da β -globina realizada nos diferentes tempos de incubação foram positivas somente no tempo zero de incubação e fracamente positiva no tempo de 10 dias, enquanto que nos tempos 20, 30 e 40 dias de incubação a PCR se apresentou negativa (Figura 27).

FIGURA 26 - PCR PARA β -GLOBINA DO SANGUE PERIFÉRICO



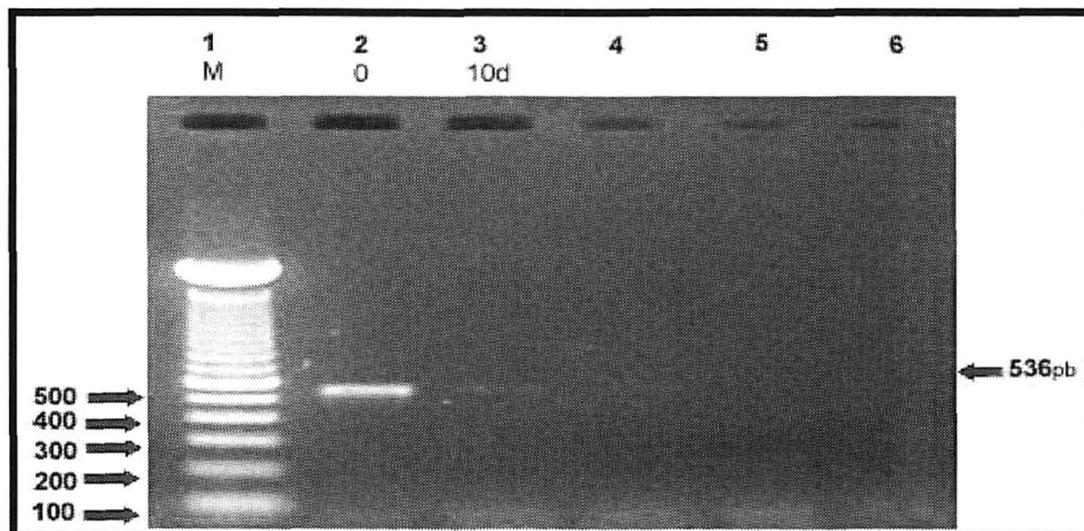
1 - Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-BRL®, *Life Technologies*)

2 a 9 - PCR positiva para β -globina

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para *M. avium* e β -globina segundo Protocolo de KULSKI (1995)

FIGURA 27- PCR PARA β -GLOBINA DOS FRASCOS DE HEMOCULTURA (MB/BACT)



1 - Marcador de peso molecular 100 bp (gibco-BRL®, *Life Technologies*);

2 - PCR positiva para β -globina no tempo 0 de incubação

3 - PCR fracamente positiva no tempo 10 dias de incubação

4, 5 e 6 - PCR negativa para β -globina nos tempos 20,30 e 40 dias de incubação.

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,5%

PCR para β -globina segundo Protocolo de KULSKI (1995)

6 DISCUSSÃO

As infecções por micobactérias são freqüentes em indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (MONTESSORI et al., 1996), sendo o *M. avium* e o *M. tuberculosis* os agentes etiológicos mais comumente identificados (MODIVELSKY et al., 1989). A forma disseminada da infecção por micobactérias em pacientes com SIDA é descrita em diferentes estudos. Uma investigação feita no Canadá, sobre a prevalência de micobactérias em amostras de sangue de pacientes HIV positivos de várias cidades, demonstrou o predomínio de *M. avium* e de *M. tuberculosis*, sendo a prevalência do *M. avium* mais elevada na maioria dos estudos (MONTESSORI et al., 1996).

Diferentes trabalhos relatam que infecções por *M. avium* ocorrem em média em 15-25% dos pacientes com SIDA (CLARK et al., 1991; HORSBURGH, 1991; NIGHTINGALE et al., 1992). A análise de achados de necrópsias comprovou que 47 a 50% dos pacientes com SIDA estavam infectados por *M. avium* (WALLACE e HANNAH, 1985). Entretanto, NIGHTINGALE, (1992) encontrou somente 12% de hemoculturas positivas para micobactérias em pacientes com SIDA.

A detecção de *M. tuberculosis* em amostras de sangue é menos freqüente, sendo sua pesquisa indicada apenas nos pacientes com SIDA, imunossupressão grave, sintomas clínicos sugestivos, ou ambos (SALTZMAN et al. 1986; BARBER, CRAVEN, McCABE, 1990; REIMER et al., 1997). Nos países industrializados, a micobacteriemia é causada principalmente por *M. avium*, enquanto que nos países em desenvolvimento a micobacteriemia é causada por *M. tuberculosis* (REYN, 1999). Nos países da África, a micobacteriemia pelo *M. tuberculosis* é muito alta (28-46%), enquanto que a causada por *M. avium* é em média de 10% (ARCHIBALD et al. 1998; GOTTEBERG, et al., 2000). As causas destas diferenças não estão totalmente esclarecidas, embora a alta prevalência na população e conseqüentemente maior exposição à tuberculose em países em desenvolvimento seja um dos principais fatores, enquanto que nos países industrializados, a tuberculose está confinada a grupos restritos. Ao contrário, o *M.*

avium é ubíquo na natureza e infecta somente pacientes imunocomprometidos, como os pacientes portadores do HIV (REYN, et al., 1996).

Há poucos estudos no Brasil referentes à prevalência de micobacteriemia em pacientes com SIDA e todos eles utilizaram a cultura como método padrão para detecção de micobactérias. Alguns destes se referem a estudos retrospectivos analisando diferentes tipos de amostras clínicas. RAMOS et al. (2000) do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (São Paulo), em 1996 analisaram retrospectivamente, a positividade para micobactérias em 51 pacientes com SIDA através de cultura em vários tipos de amostras clínicas, incluindo sangue. Estes autores observaram a presença de *M. tuberculosis* em 5% e de *M. avium* em 17% das amostras de sangue. BARRETO et al. (1993) realizaram estudo em cultura de aspirados de medula óssea de pacientes HIV positivos, de maio de 1990 a abril de 1992, no Instituto de Infectologia Emilio Ribas (São Paulo) e encontraram uma prevalência de 18,4% para *M. avium* e de 7,2% para *M. tuberculosis*. Em outro trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo), no período de 1994 a 1997, AILY et al. (1999) analisaram 1521 amostras de sangue de pacientes com SIDA e número de linfócitos $CD4 < 100 \text{ cel}/\mu\text{l}$ e encontraram uma positividade de 9,9% para micobactérias, utilizando o sistema bifásico de hemocultura.

No presente trabalho, a prevalência de hemoculturas positivas para micobactérias foi de 15% (12/80), tendo-se utilizado sistema BacT/Alert. Esta prevalência foi inferior às observadas por RAMOS et al. (2000) de 22% e por BARRETO et al. (1993) de 25,6%. No entanto, deve-se considerar que os estudos realizados por Ramos foram antes do advento da terapia anti-retroviral combinada potente, iniciada em 1997 (coquetel anti-HIV) com base em uma combinação de anti-retrovirais que incluem um inibidor de protease e inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeos e nucleosídeos. Todos os pacientes incluídos no presente estudo estavam sob uso da terapia anti-retroviral combinada potente. Além disso, deve-se considerar que BARRETO et al. (1993) analisaram a prevalência de micobactérias em amostras de aspirado de medula óssea. A menor prevalência de micobactérias observada por AILY et al. (1999) provavelmente deve-se a sensibilidade da metodologia utilizada. Enquanto esses autores utilizaram o sistema bifásico de hemocultura que consiste de um meio sólido de Lowenstein-Jensen e meio líquido de Middlebrook 7H9, no presente trabalho utilizou-se o sistema automatizado de

monitoramento contínuo. Vários estudos têm demonstrado que a utilização de sistemas automatizados de monitoramento contínuo aumenta a sensibilidade e reduz o tempo para a detecção de micobactérias em amostras de *sangue* (METCHOCK, NOLTE e WALLACE, 1999).

Neste estudo, a prevalência do *M. avium* foi de 8,8% (7/12) e do *M. tuberculosis* de 6,2% (5/12) das amostras. Apesar de a prevalência de micobacteriemia por *M. avium* ser inferior às relatadas em estudos anteriores, de 15 a 24% (HORSBURGH, 1991), esta foi superior aos resultados recentemente descritos por JACOMO et al. (1998) no qual apenas 5% das amostras de sangue foram positivas para *M. avium*. Esta diferença na prevalência de micobacteriemia entre os estudos publicados anterior e recentemente deve estar relacionada a utilização da terapia anti-retroviral combinada potente. Isto porque estudos realizados até 1997, não estavam associados ao emprego da terapia anti-retroviral combinada potente. Após a introdução deste esquema terapêutico, diferentes estudos indicaram que houve uma diminuição significativa (>50%) das infecções oportunistas no período de 1992 a 1997, principalmente em relação à prevalência de *M. avium* e *Cytomegalovirus* (KOVACS, 2000). Além disso, a utilização desta terapia anti-retroviral causou grande impacto na queda do índice de mortalidade, que caiu de 21,9 / 100 pessoas com SIDA em 1994 para 3,7/ 100 pessoas com SIDA em 1997 (PALELLA et al.,1998). Dados referentes ao risco de adoecimento por tuberculose em indivíduos HIV positivos sugerem que este reduziu em aproximadamente 10 vezes e que a incidência da tuberculose nestes pacientes diminuiu em até 75 vezes quando comparada às taxas encontradas antes do advento da terapia anti-retroviral combinada potente (BRASIL, Comitê Assessor para Co-infecção HIV/Tuberculose, 2000).

Enquanto vários estudos relatam dados sobre a micobacteriemia causada por *M. avium*, os relatos de micobacteriemia por *M. tuberculosis* são escassos. A bacteriemia por *M. tuberculosis* era incomum até o advento da SIDA, e a maioria dos estudos se baseou em uma casuística pequena. A prevalência de 6,2% encontrada neste trabalho para *M. tuberculosis* é similar à observada para *M. avium* (8,8%), diferindo de outros estudos de países industrializados onde o *M. avium* é mais frequente e de países em desenvolvimento onde o *M. tuberculosis* tem maior prevalência. Porém, como já mencionado anteriormente a baixa prevalência de

micobactérias para *M. avium* e *M. tuberculosis* nos pacientes aqui estudados deve estar relacionada a utilização da terapia anti-retroviral. Entretanto, estudos epidemiológicos com maior número de amostras deverão ser realizados para confirmar a real prevalência de *M. avium* e *M. tuberculosis* nos pacientes com SIDA no nosso meio, após a introdução da terapia anti-retroviral.

As freqüências dos isolados de *M. avium* 7/12 (58,3%) e de *M. tuberculosis* 5/12 (41,6%) encontradas no presente estudo diferem daquelas publicadas por RAMOS et al. (2000), que foram de 45% para *M. avium* e 55% para *M. tuberculosis*. Esta diferença provavelmente está relacionada ao tipo de amostra analisada, pois nesta pesquisa analisou-se somente amostras de sangue, onde o *M. avium* é mais frequente, enquanto que no trabalho de Ramos, as micobactérias foram isoladas de diferentes amostras clínicas como escarro, sangue, biópsias e liquor. A diferença relacionada ao tipo de amostras analisadas pode ser confirmada pela concordância dos resultados encontrados neste estudo e os obtidos por AILY et al. (1999), que também utilizaram amostras de sangue e demonstraram uma freqüência de 53,8% de culturas positivas para *M. avium*. Portanto, o uso de diferentes amostras clínicas também pode influenciar a detecção do *M. avium* e do *M. tuberculosis*.

A susceptibilidade a infecções oportunistas aumenta quando a imunodeficiência se torna mais severa. Nos pacientes com SIDA, o número de linfócitos CD4⁺ é o valor preditivo mais fidedigno para infecções oportunistas (KOVACS,2000). Isto porque, a principal resposta protetora contra os microorganismos intracelulares é a imunidade celular mediada pelas células T, onde os linfócitos CD4⁺ têm um papel fundamental. Assim, indivíduos com imunidade celular deficiente como os pacientes com SIDA, tornam-se suscetíveis a infecções por bactérias intracelulares como as micobactérias (CREVEL, OTTENHOFF, MEER, 2002).

O principal fator de risco para infecções oportunistas pelo *M. avium* está relacionado com o número de linfócitos CD4⁺, e não com a idade, sexo ou raça (NIGHTINGALE et al., 1992).

Enquanto que, a freqüência da co-infecção pelo HIV e pelo *M. tuberculosis* é determinada pela epidemiologia de cada destas doenças em uma determinada população. Altas taxas desta co-infecção são encontradas em indivíduos

desabrigados, usuários de drogas, população não branca, imigrante e refugiada de países em desenvolvimento (COCK et al.,1996).

Em estudos conduzidos antes da terapia anti-retroviral potente, observou-se que pacientes com linfócitos CD4⁺ acima de 200 cel/ μ l tinham baixo risco para infecções oportunistas, e que o risco dos pacientes adquirirem infecções oportunistas aumenta com a diminuição do número de células CD4 (KOVACS,2000). Apesar da carga viral do HIV fornecer um prognóstico para o risco de SIDA, esta não se correlaciona com o risco específico de infecções oportunistas (KOVACS,2000). Em um estudo onde se relacionou a incidência do *M. avium* com o número de células CD4, evidenciou-se a infecção em 39% \pm 6% dos pacientes com células CD4 \leq 10cel/ μ l e em 3% \pm 1% dos pacientes com células CD4 100-199cel/ μ l (NIGHTINGALE et al.,1992). As infecções por *M. tuberculosis* costumam ocorrer quando o paciente apresenta contagem de linfócitos CD4 entre 200 a 300 cel/ μ l (COCK et al.,1996), porém as formas extrapulmonares costumam aparecer quando os linfócitos CD4 estão mais baixos, entre 15 a 114 cel/ μ l (REYN, 1999).

No presente trabalho, um dos critérios de inclusão dos pacientes foi a contagem de linfócitos CD4 \leq 100cel/ μ l. A micobacteriemia pelo *M. avium* foi detectada em pacientes com contagem de linfócitos TCD4⁺ a partir de 7cel/ μ l, sendo a média de linfócitos TCD4⁺ de 48,5cel/ μ l nestes pacientes. Esta média, no entanto não inclui um paciente com contagem de linfócitos CD4 de 311cel/ μ l, o qual apresentou infecção pelo *M. avium*. Por outro lado, as infecções por *M. tuberculosis* ocorreram em pacientes com linfócitos TCD4⁺ acima de 50cel/ μ l, em média de 80,0 cel/ μ l. Estes dados corroboram o fato de que indivíduos com imunossupressão mais grave estão suscetíveis a infecções por *M. avium*, e que a infecção por *M.tuberculosis* em formas extra pulmonares também costumam aparecer com contagens mais baixas de linfócitos TCD4⁺.

Apesar de seis pacientes apresentarem contagem de CD4 \geq 100cel/ μ l, foram incluídos no presente estudo por manifestarem sintomas clínicos sugestivos de micobacteriemia. Dois destes pacientes apresentaram hemocultura positiva para *M. avium*, com contagem de células CD4 de 112 cel/ μ l e de 311cel/ μ l, respectivamente. Esse último paciente apresentava o *M. avium* há dois anos, com linfadenopatia e fosfatase alcalina elevada, sugerindo que apesar da reconstituição

imunológica, o sistema imunológico não foi capaz de debelar o microorganismo, ou uma provável resistência aos tratamentos preconizados. Também há limitações quanto à terapia anti-retroviral, pois apesar de muitos pacientes receberem terapia anti-retroviral nem todos acabam aderindo totalmente à terapêutica. Além disso, muitos pacientes podem apresentar intolerância à medicação ou mesmo aderindo ao tratamento, a imunidade não é restaurada a níveis que reduzam os riscos às infecções oportunistas (KOVACS, 2000).

O diagnóstico laboratorial clássico das micobactérias é realizado pelo isolamento e identificação das espécies. Os métodos de escolha para a identificação definitiva das espécies na maioria dos laboratórios são: a baciloscopia, a cultura em meio sólido e os testes bioquímicos (POONPILAS, 2001). O cultivo em meio solidificado costuma levar 4 semanas para se obter um inóculo suficiente para realizar os testes bioquímicos (KOX et al., 1995). No presente trabalho, todos os frascos de hemoculturas positivos foram semeados em meios de Löwenstein-Jensen e realizada a identificação bioquímica de acordo com o Manual de Bacteriologia da Tuberculose, (1994). Não houve discrepância nos resultados de identificação das espécies. Oito frascos (8/80) foram detectados como positivos no sistema *BacT/Alert*. Após os procedimentos de baciloscopia, sub cultivo em meio de Löwenstein-Jensen e PCR para *M. avium*, *M. tuberculosis* e *Mycobacterium sp* todos os resultados se apresentaram como negativos. Portanto, essas amostras forneceram um sinal falso positivo nos frascos de hemocultura, pelo sistema *BacT/Alert*. Uma desta causas como descrito pelo fabricante pode ser a alta concentração de leucócitos nessas amostras (ORGANON TEKNIKA, 2000). Contudo, após investigação dos prontuários desses pacientes, sete pacientes apresentavam leucopenia na época da coleta das hemoculturas com contagem de leucócitos de 2.400/ μ l, 2.400/ μ l, 2.800/ μ l, 2.900/ μ l, 3.200/ μ l, 4.000/ μ l e 4.200/ μ l e somente 1 paciente apresentou leucócitos de 12.000/ μ l. Portanto, o sinal positivo detectado pelo sistema *BacT/Alert* nessas amostras não é justificado por um alto número de leucócitos, sendo provavelmente devido a outros fatores no sistema de monitoramento.

O diagnóstico inicial da infecção por micobactérias é freqüentemente baseado em sinais e sintomas clínicos. A correta e rápida identificação das espécies de micobactérias é importante para o direcionamento correto da terapêutica que se

pode iniciar com a terapia tripla ou quádrupla dependendo da micobactéria isolada (HORSBURGH,1991), havendo portanto uma necessidade de se diminuir o tempo para a sua identificação. O *Mycobacterium tuberculosis* não pode ser distinguido das micobactérias atípicas pela baciloscopia, e os métodos tradicionais descritos acima exigem um tempo prolongado para a sua identificação. O tratamento para *M. tuberculosis* difere daquele utilizado para a infecção por *M. avium*, que costuma ser mais resistente ao tratamento preconizado (ELLNER, GOLDBERGER, PARENTI,1991). Pacientes com micobacteriemia disseminada por *M. tuberculosis* podem ter uma sobrevida maior se começarem precocemente o tratamento adequado. Além disso, há necessidade de isolamento do paciente quando este for infectado por *M. tuberculosis* (BARBER; CRAVEN; MCCABE, 1990; KOX et al., 1995).

Para se reduzir o tempo de identificação e aumentar a sensibilidade e especificidade dos métodos de identificação das micobactérias, várias alternativas têm sido estudadas. O uso de sondas de ácidos nucléicos marcados radioativamente ou não, oferecem uma alternativa rápida e reprodutível para identificação precoce das espécies de micobactérias. Porém, estas sondas comerciais são de alto custo e muitas vezes apresentam problemas de especificidade (SION et al., 1999). Estudos realizados por LOURO et al. (2001) com sondas comerciais Accu-Probe (*Gene-Probe, San Diego, Calif. USA*) sugerem que a sua utilização é adequada para detecção do *M. tuberculosis*, porém é restrita para outras micobactérias. A sensibilidade na identificação do *M. gordonae* e do *M. avium* foi de 50% e 24,2%, respectivamente, com resultados falsos negativos com o "cut off" de 30,000 (RLU) recomendado pelo fabricante, demonstrando que este teste não possui a sensibilidade necessária para uso em diagnóstico laboratorial para identificação de micobactérias atípicas.

As técnicas de biologia molecular, ou seja, a análise e caracterização do material genético, representam um recurso extremamente importante no diagnóstico laboratorial rápido e eficaz de uma série de doenças, sobretudo as doenças infecciosas e de caráter genético. A PCR é uma das técnicas mais difundidas para o diagnóstico precoce das infecções oportunistas em pacientes imunodeprimidos. Vários investigadores têm descrito a PCR como uma técnica rápida e sensível para a detecção do DNA das micobactérias em espécimes clínicos e isolados de cultura

(KULSKI et al.,1995; FOLGUEIRA et al.,1996; FRANCESCO et al.,1996; SION et al.,1999;).

No presente trabalho, as micobactérias foram detectadas diretamente do sangue periférico e a partir dos frascos de hemocultura através da PCR utilizando-se diferentes protocolos. Com isto obteve-se bons resultados na identificação precoce das micobactérias a partir dos frascos positivos de hemocultura, com menor custo que as sondas comerciais.

Os procedimentos para a PCR devem levar em conta os cuidados para evitar resultados falsos positivos pela contaminação entre amostras ou carreamento de amplicons. Resultados falsos negativos podem ocorrer devido à presença de Rnases ou Dnases que degradam os ácidos nucléicos e inibidores na amostra clínica, que podem ser substâncias como o fenol, heparina, heme, poliaminas, polissacarídeos de plantas, urina e alginato de cálcio. O mecanismo mais conhecido para a inibição da PCR, é através da inibição direta da enzima DNA polimerase (WIEDBRAUK, WERNER, DREVON,1995).

Foi demonstrado que a inibição da PCR pode ocorrer em mais de 40% das análises em amostras de sangue (BOGNER et al.,1997). No presente estudo, a presença de inibidores no sangue periférico foi investigada pela detecção do gene da β -globina através da PCR, com "*primers*" específicos que serviram de controle para a PCR. Através deste controle verificou-se que não ocorreram inibições da PCR, durante a extração e a purificação do DNA através da metodologia utilizada (*Kit Genomic Prep*). O uso deste sistema apresentou portanto bons resultados na detecção do DNA nas amostras de sangue periférico.

Entretanto, a detecção do gene β -globina a partir dos frascos de hemoculturas negativas, após 42 dias de incubação, foram realizadas sem sucesso. Após a elaboração de um experimento para verificar se a integridade do DNA da β -globina não foi comprometida após 42 dias de incubação com agitação constante e temperatura de 37°C, observou-se que só é possível amplificar o gene da β -globina de frascos de hemoculturas até no máximo 10 dias de incubação. Após 42 dias de incubação, que é o tempo preconizado para incubação dos frascos de MB/BacT no Sistema *BacT/Alert*, o DNA da β -globina presente nos frascos se degrada, não possibilitando a amplificação da β -globina destas amostras após o tempo total de

incubação.

O impedimento para o uso rotineiro da PCR na identificação de micobactérias, se deve à dificuldade na extração do DNA genômico, pela complexa estrutura da parede celular das micobactérias que possuem uma alta quantidade de lipídios e ácidos micólicos, resistentes ao simples processo de lise com álcalis fortes ou ácidos.

Vários métodos de extração do DNA de micobactérias foram testados, como: a utilização de enzimas (proteínase K ou lisozimas) e desnaturantes de proteína (fenol e clorofórmio). Porém esses métodos se mostraram ineficazes em razão da lise insuficiente das células, perda do DNA durante o processo de purificação ou da presença de inibidores da PCR (KULSKI e PRYCE, 1996).

Neste trabalho, a primeira tentativa de extração de DNA das micobactérias do frasco de hemocultura positiva (*MB BacT/Organon*) foi utilizando-se o *Kit Genomic Prep Blood DNA Isolation (Amersham Pharmacia Biotech)*. Contudo, este método se apresentou totalmente ineficaz na amplificação do DNA genômico das micobactérias, provavelmente por inadequada lise da parede celular das micobactérias ou pela falha na remoção dos inibidores da PCR.

Em seguida, foi utilizada a metodologia descrita por FREDERICKS e RELMAN (1998), que obtiveram sucesso na amplificação do DNA de bactérias a partir de frascos de hemoculturas (*BacT/Alert anaerobic media, Organon Teknika*), através do método de extração orgânica com álcool benzílico e guanidina hidrocloreídrica. No presente estudo, este método também não possibilitou amplificar o DNA das micobactérias. Uma possível causa foi a utilização de quantidade insuficiente de tampão de lise, na proporção de 1:1 da amostra com o tampão de lise, quantidade esta que foi provavelmente insuficiente para lisar a parede celular das micobactérias. Além disso, os experimentos de FREDERICKS e RELMAN foram realizados com *Escherichia coli* e *Bordetella pertussis*, bactérias que não possuem as características da parede celular das micobactérias.

O método de extração descrito por BOOM, et al. (1990) foi a terceira tentativa utilizada nesta pesquisa. Este método baseia-se na liberação de ácidos nucleicos pela ação do tiocianato de guanidina e TritonX-100, reagentes que lisam qualquer partícula viral e células presentes na amostra, enquanto as Rnases e Dnases presentes na amostras são inativadas pela alta concentração de sal. Em

seguida, todos os ácidos nucleicos presentes na amostra ligam-se às partículas de sílica adicionadas à reação. Estas partículas, agindo como fase sólida, são lavadas várias vezes, e finalmente os ácidos nucleicos são eluídos da fase sólida (BOOM et al.,1990). Este método porém apresentou baixa reprodutibilidade nos experimentos conduzidos, algumas vezes apresentado amplificação e outras não.

FREDERICKS E RELMAN (1998), através de vários experimentos, demonstraram que um dos produtos que inibia a amplificação na PCR era o polianetol sulfato de sódio (SPS), um dos componentes dos frascos de hemocultura MB/Bact. SPS é um anticoagulante que participa também na inibição da fagocitose, inativa a cascata do sistema complemento, participa na remoção de certos antibióticos como os aminoglicosídeos-aminocitol, polimixinas e de proteínas catiônicas, aumentando assim a taxa de crescimento bacteriano (EDBERG e EDBERG,1993).

Assim como as moléculas de DNA, o SPS é um poliânion de alto peso molecular, solúvel em água e insolúvel em álcool, por isso se liga às partículas de sílica na presença de caotrópicos, sendo eluído junto com o DNA e age inibindo a reação da PCR. FREDERICKS e RELMAN (1998) utilizaram o álcool benzílico no processo de purificação do DNA bacteriano, a fim de eliminar o SPS. Na metodologia apresentada pelos autores o tampão de lise utilizado foi guanidina hidrocloreídrica (5.0M guanidina hidrocloreídrica,-100mM Tris, pH 8,0) enquanto no presente trabalho foi utilizado o tampão de lise (5 mol/L tiocianato de guanidina, Triton-X-100 e Tris/HCl), que faz a quebra do SPS em álcool benzílico. A partir desses dados, incluiu-se no método de extração de Boom mais um passo de lavagem utilizando o álcool benzílico, visando eliminar o SPS presente na hemocultura. Com esse novo método de extração (método de Boom modificado) obteve-se 100% de amplificação das amostras de hemoculturas positivas, demonstrando ótima reprodutibilidade.

A utilização de diferentes tampões de lise (O e R) teve influencia na amplificação do DNA das micobactérias de acordo com o método de extração utilizado. A composição do tampão O (tiocianato de guanidina 5 mol/l, Triton X-100, Tris/HCl) difere do tampão R (tiocianato de guanidina 68%, 3% ditiotreitól,Tris-HCl <1%glicogênio). O tampão de lise R apresentou superior qualidade ao tampão de lise O quando se utilizou o método de Boom. Quando se utilizou o tampão de lise O,

não ocorreram ampliações do DNA das micobactérias de muitos frascos de hemoculturas positivas. Uma das causas pode estar relacionada a composição do tampão de lise; no tampão "R" tem-se o glicogênio que ajuda a precipitar o DNA das amostras. O método de Boom modificado por outro lado, não apresentou diferença nas bandas amplificadas, utilizando os diferentes tampões, demonstrando ser efetivo independente do tampão de lise utilizado.

Em relação à concentração do DNA extraído dos frascos de hemocultura, observou-se diferença significativa entre as concentrações obtidas através dos métodos de Boom e Boom modificado ($p=0.027$). Apesar destas medidas terem sido realizadas em somente 7 amostras, o método de Boom modificado apresentou uma concentração de DNA de micobactérias significativamente maior do que aquela obtida pelo método de Boom, demonstrando ser mais eficaz na extração do DNA.

Para detecção do *M. avium* utilizou-se neste estudo dois diferentes protocolos de PCR. O primeiro protocolo seguiu a orientação das pesquisas realizadas no laboratório de Biologia Molecular do Instituto da Criança da Universidade de Heidelberg, Alemanha, coordenado pelo Dr. Walter HAAS, em 1997 (comunicação pessoal, dados não publicados). Os "primers" utilizados nesse protocolo são seqüências de inserção IS1245. As seqüências de inserção apresentam várias características e são utilizadas em avaliações epidemiológicas e em estudos de taxonomia e filogenética (GUERRERO et al., 1995). As seqüências de inserção IS 1245 são específicas para o *M. avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *silvaticum*).

Uma pesquisa conduzida por BEGGS, STENANOVA e EISENACH (1999), mostrou que em pacientes HIV positivos, 85% dos isolados de micobactérias eram *M. avium* e em pacientes HIV negativos 86% dos isolados eram *M. intracellulare*. Um total de 15% dos isolados de *M. avium* dos pacientes com HIV não possuía as seqüências de inserção IS1245, enquanto 7% dos isolados de *M. intracellulare* possuíam as inserções IS1245. Em razão disso, outro protocolo de PCR para *M. avium* foi utilizado nas amostras dos frascos de hemocultura que foram positivas para *M. avium*, a fim de verificar possíveis diferenças na amplificação com "primers" direcionados para diferentes regiões do DNA desta micobactéria. A região escolhida para ser amplificada foi 16S rRNA do *M. avium* segundo KULSKI et al. (1995). Os resultados obtidos não demonstraram diferenças de amplificação das

amostras de hemoculturas positivas para *M. avium* com "primers" da região 16S rRNA, com relação ao "primers" da região IS1245.

A PCR para *M. tuberculosis* foi realizada conforme descrito por EISENACH et al., (1990), utilizando-se "primers" da seqüência de inserção IS 6110, específicos para o complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*). As seqüências de inserção IS 6110 estão repetidas no DNA várias vezes (10 a 20 cópias) na maioria das cepas de *M. tuberculosis*, enquanto no *M. bovis* o número de cópias da IS 6110 é menor (1 a 5 cópias). A especificidade e a natureza repetitiva dos IS 6110 faz com que seja o alvo ideal para a amplificação do DNA do *M. tuberculosis* pela PCR.

As PCRs realizadas dos frascos positivos de hemoculturas evidenciaram uma sensibilidade e especificidade de 100% na detecção de micobactérias. As taxas de erro falso positivo, isto é, taxa que indica falsamente a presença quando negativo, assim como as taxas de erro falso negativo, isto é, a falha em detectar presença quando verdadeiro (JEKEL, ELMORE, KATZ, 1999), foram ambas de 0,0%. Uma das amostras de hemocultura foi detectada como positiva após 9,3 dias no sistema *BacT/Alert*, porém apresentou baciloscopia negativa na coloração de Zielhl-Gabbet. Após a realização da PCR, esta amostra foi positiva para a presença de *M. avium*. O crescimento bacteriano em meio de Löwenstein-Jensen desta amostra só ocorreu após 40 dias de incubação, sendo então confirmado como *M. avium* através de testes bioquímicos. Este caso demonstra a utilidade da PCR na confirmação e identificação precoce das micobactérias quando realizada de amostras de hemoculturas positivas.

A PCR realizada do DNA extraído diretamente do sangue periférico dos 80 pacientes, somente demonstrou positividade para *M. avium* em 3 amostras, as quais também apresentaram hemocultura positiva. Os outros 4 pacientes que apresentaram hemocultura positiva para *M. avium*, tiveram PCR negativa no sangue periférico. Portanto, a PCR para detecção de *M. avium* do sangue periférico apresentou uma sensibilidade de 42,9%, especificidade de 100%, taxa de erro falso positivo de 0,0% e taxa de erro falso negativo de 57,1% quando comparada a hemocultura. As hemoculturas dos três pacientes que apresentaram PCR positiva para *M. avium* foram detectadas como positivas no sistema *BacT/Alert* em média em 6 dias de incubação, revelando amostras com alta densidade de bactérias.

Enquanto que, as 4 amostras que apresentaram PCR negativa no sangue periférico, foram detectadas como positivas no Sistema *BacT/Alert*, em média após 12 dias de incubação. Estes dados sugerem que estas amostras possuíam uma densidade menor de bactérias.

Nenhum dos pacientes estudados apresentou PCR positiva para *M.tuberculosis* no DNA extraído a partir do sangue periférico. Portanto, o *M.tuberculosis* só foi detectado através da PCR, a partir do DNA extraído dos frascos de cultura. Assim, tanto a sensibilidade como a especificidade da PCR para detecção do *M. tuberculosis* do sangue periférico foi de 0,0% e a taxa de erro falso negativo de 100,0%, quando comparados com a hemocultura. Estes resultados foram confirmados através de outra PCR, utilizando o Kit Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) Test Roche, onde todas as 5 amostras de sangue periférico dos pacientes com hemocultura positiva para *M. tuberculosis* mostraram-se negativas, confirmando os dados obtidos pela PCR conforme o protocolo descrito por EISENACH (1990).

Os resultados negativos da PCR do sangue periférico para *M. tuberculosis* devem estar relacionados com a baixa densidade de micobactérias presentes no sangue durante a micobacteriemia por *M. tuberculosis*.

Estudos realizados por KIEHN e CAMMARATA (1986) mostraram o comportamento de hemoculturas de 38 pacientes em relação ao número de unidades formadoras de colônias para *M. avium*: 14 culturas apresentavam < 1 UFC/ml, 114 culturas apresentavam entre 1 a 100 UFC/ml, 30 culturas entre 101 a 1000 UFC/ml e 19 culturas > 1000 UFC/ml. As hemoculturas positivas para *M.tuberculosis* apresentavam um menor número de UFC: 2 culturas < 1 UFC/ml, 1 cultura com valor entre 1 a 100 UFC/ml e 1 cultura >1000 UFC/ml. Este estudo demonstra que a micobacteriemia por *M. tuberculosis* aparece em menor número e em menor densidade de bactérias quando comparada com a bacteriemia por *M.avium*. No presente trabalho as hemoculturas levaram em média 16,8 dias para serem detectadas como positivas para *M. tuberculosis* no Sistema *BacT/Alert*, demonstrando baixa densidade de micobactérias nas amostras. Portanto, estes resultados confirmam a hemocultura como um método mais sensível na detecção de micobactérias em amostras de sangue.

A baixa sensibilidade obtida através da PCR para a detecção de

micobactérias diretamente do sangue periférico sugere 3 hipóteses: tanto o *M. avium* como o *M. tuberculosis* circulam no sangue em baixo número, em bacteriemias intermitentes e em baixa densidade, não permitindo a sua detecção em todo o tempo e em todas as amostras. As hemoculturas para micobactérias, requerem em média 12 dias para serem detectadas como positivas em sistemas automatizados, demonstrando a alta prevalência de pacientes com baixa densidade de bacteriemia (BOGNER, 1997).

Além disso, este problema deve estar relacionado com a pequena quantidade de amostra processada nos métodos moleculares. A detecção de hemoculturas positivas está diretamente relacionada com a quantidade de volume sangüíneo utilizado, sendo esta a variável mais importante para otimização do crescimento bacteriano. O número de microorganismos presentes no sangue de adultos é pequeno, menor que 10 UFC/ml e muitas vezes até menor que 1 UFC/ml. Em adultos, cada mililitro de sangue adicionado nas hemoculturas aumenta a possibilidade de recuperação bacteriana em 3% (REIMER, 1997). Enquanto que, nas hemoculturas utilizou-se em média 5 ml de sangue, na PCR, o processamento ocorreu com amostras aproximadamente 20 vezes menores, de 325 µl de sangue total.

Um dos objetivos deste trabalho foi também a análise de um método sensível para o diagnóstico precoce de micobacteriemia em pacientes imunocomprometidos.

A identificação precoce das espécies de micobactérias, permite um direcionamento clínico mais rápido tanto na instituição da terapêutica como no manejo desses pacientes.

A PCR realizada diretamente do sangue periférico possibilitaria detecção rápida, específica e com um custo menor de micobacteriemia. Porém, se mostrou menos sensível que a hemocultura.

Por outro lado, a utilização da PCR permitiu a identificação precoce das micobactérias dos frascos de hemoculturas enquanto que nos métodos tradicionais leva-se em torno de 40 dias para a identificação da espécie de micobactérias no presente trabalho levou-se em média três dias com um ganho de 37 dias. A sensibilidade e especificidade foram de 100% e com menor custo do que as sondas comerciais comumente utilizadas. O método de extração do DNA dos frascos de

hemocultura tem um papel preponderante na sensibilidade da PCR. O método de Boom modificado, desenvolvido neste estudo, possibilitou uma amplificação eficaz de todas as amostras positivas dos frascos de hemoculturas.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que vários fatores influenciam a detecção de micobacteriemia através de PCR, tanto em amostras de sangue periférico, como a partir dos frascos de hemoculturas. O método de extração do DNA empregado, quando realizado diretamente dos frascos de hemocultura tem influência direta sobre a sensibilidade da PCR e quando realizado do sangue periférico apresentou-se relacionado à densidade de bactérias presentes nas amostras.

Através de revisão bibliográfica não foram encontrados relatos no Brasil sobre a investigação de micobacteriemia em pacientes com SIDA, utilizando-se a PCR "in house" em amostras de sangue periférico e nos frascos de hemocultura de sistemas automatizados, sendo este um estudo pioneiro no nosso meio.

7 CONCLUSÕES

O método de Boom modificado para extração e purificação do DNA das micobactérias desenvolvido no presente trabalho, mostrou-se eficaz para amplificação e identificação das micobactérias dos frascos de hemocultura através da PCR, apresentando uma sensibilidade e especificidade de 100%

Quando comparada com a hemocultura, a PCR diretamente do sangue periférico, apresentou sensibilidade de 42,9% e especificidade de 100% na detecção do *Mycobacterium avium*. Na detecção de *Mycobacterium tuberculosis* tanto a sensibilidade como a especificidade foi de 0%.

A prevalência de micobacteriemia em pacientes com SIDA, detectada através de hemocultura foi de 15%, sendo 8,8% para o *Mycobacterium avium* e 6.2 % para o *Mycobacterium tuberculosis*.

A PCR realizada a partir do DNA extraído dos frascos de hemocultura permite uma identificação precoce das micobactérias, trazendo benefícios para um melhor direcionamento terapêutico e manejo dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. ; POBER, J. S. **Imunologia celular & molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro : Revinter, 1999.
- AILY, D. C. G. et al. Systematic mycobacterioses in AIDS patients as determined by blood cultures on biphasic medium. **Rev. Argent. Microbiol.**, Buenos Aires, v.31, n.2, p.53-57, 1999.
- ALKHATIB,G. et al. CC CKR5: a rantes , MIP-1 β , MIP-1 α receptor as a fusion cofactor for *M. avium* macrophage-Tropic HIV-1. **Science**, Washington, DC., v.272, p.1955-1958,1986
- ARCHIBALD, L. K.; PALLANGYO, K. J.; REILER, L. B. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* bloodstream infection in febrile hospitalized adult in Dares Salaam, Tanzania. **Clin. Infect.Dis.**, Chicago, v.26,p.290-296,1998.
- ASLANZADEH, J. Molecular techniques in laboratory diagnosis of infectious diseases. In: COLEMAN, W. B. ; TSONGOLIS, G. J. **Molecular diagnostics for the clinical laboratorian**. Totowa : Humana Press, 1997. p.341-360.
- BACK, C.M. et al. Co-infection of macrophage modulates interferon gamma and tumor necrosis factor-induced activation against intracellular pathogens. **J. Exp. Med.**, New York, v.172, p.977-980, 1990.
- BARBER, T. W.; CRAVEN ,D. E.; MCCABE, W. Bacteremia due to *Mycobacterium tuberculosis* in patients with human immunodeficiency virus infection. **Medicine**, Baltimore, v.69,n.6, p.375-383,1990.
- BARON,E.E.; PETERSON,L. R.;FINEGOLD,S. M. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 9ed. Baltimore : Mosby, 1994.
- BARRETO, A. et al. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from bone marrow aspirates of AIDS patients in Brazil. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.168, n.3, p.777-779, 1993
- BEGGS,M. L.; STEVANOVA,R.; EISENACH,K. D. Species identification of *Mycobacterim avium* complex isolates by a variety of molecular techniques. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.38,n.2,p.508-512, 2000.
- BERMUDEZ,L. E.;ENKEL, H.; YOUNG,L. S. Role of cell wall proteins in the pathogenesis of *M. avium* complex infection. In: INTERSCIENCE CONFERENCE ANTIMICROBIOLOGY AGENTS. CHEMOTHERAPY PROGRAM (29TH : Wasghinton, 1989). **Annals...** Wasghinton D.C : American Society for Microbiology,1989.. Abstr.328, p.155.

- BOGNER, J.R. et al. Patterns of *M. avium* culture and PCR positivity in Immunodeficient HIV infected patients: progression from localized to systematic disease. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 29, p.579-584, 1997.
- BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.28, p.495-503, 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional De Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. 2ed. Rio de Janeiro, 1994.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. **Diagnóstico sorológico do HIV - Testes de Triagem**. 1997.
- CHIN, D. P. et al. *M. avium* complex (MAC) in the respiratory or gastrointestinal tract precedes *M. avium* bacteremia. **Front Mycobacteriol.**, v.15, 1992.
- CHIU, J. et al. Treatment of disseminated *M. avium* complex infection in AIDS with amikacin, ethambutol, rifampin, and ciprofloxacin. **Ann. Intern. Med.**, Boston, v.113, p.358-361, 1990.
- CLARK, R. et al. Hematogeneous dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with AIDS. **Rev. Infec. Dis.**, v.13, p.1089-1092, 1991.
- CLAVEL, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, Washington, DC., v.233, p.343-346, 1998.
- COCK, K.M. et al. Research issues involving HIV-associated tuberculosis in resource poor countries. **JAMA**, Philadelphia, v.276, p.1502-1507, 1996.
- COLLINS, F. M. The immunology of tuberculosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v.125, n.3, p42-49, 1982.
- CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H. M.; MEER J. W.M. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, DC., v. 15, n.2, p.294-309, 2002.
- DANNENBERG JR., A. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. **Immunol. Today**, v.12, p. 228-233, 1991.
- DAUTZENBERG, B. et al. Activity of clarithromycin against *M. avium* infection in patients with the acquired immune deficiency syndrome. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v.144, p.564-569, 1991.
- DENG, H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, London, v.381, p.661-666, 1996.
- DETONI, M. Aids já matou mais de 17 milhões na África. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 11 fev. 2001. Caderno Mundo.
- EDBERG, S.C.; EDBERG, M. K. Inactivation of polyanionic detergent sodium polyanethosulfonate by hemoglobin. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v. 18, n.5, p.1047-1050, 1983.

- EISENACH, K. D. et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.161, p.977-981, 1990.
- EISENSTADT, J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* and other nontuberculous mycobacteria. In: MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. **Textbook of diagnostic microbiology**. London: W.B Saunders, 1995. p.635-676.
- ELLNER, J. J.; GOLDBERGER, M. J.; PARENTI, D.M. *M. avium* Infection and AIDS: a therapeutic dilemma in rapid evolution. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.163, p.1326-1335, 1991.
- ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, DC., v.252, p.1643-1651, 1991.
- FARER, L.; LOWELL, M.; MEADOR, M. P. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. **Am. J. Epidemiol.**, v. 109, p.205-217, 1979.
- FAUCI, A.S. Multifactorial nature of Human immunodeficiency virus disease; implications for therapy. **Science.**, v.262, p.1011-1018, 1993.
- FAUCI, A. S. Host factors and the pathogenesis of HIV- induced disease. **Nature**, London, v.384, p.529-534, 1996.
- FENG, Y. et al. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor. **Science**, Washington, DC., v.272, p.872-876, 1996.
- FERRARIO, G. et al. PCR-hybridization assay for *M. avium* complex: optimization of detection in peripheral blood from humans. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.39, n.4, p.1638-1643, 2001.
- FOLGUEIRA, L. et al. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.3, p.512-515, 1996.
- FRANCESCO, M. A. et al. Detection and Identification of *M. avium* in blood of AIDS patients by polymerase chain reaction. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v.15, n.7, p.551-555, 1996.
- FREDRICKS, D. N.; RELMAN, D.A. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.36, n.10, p.2810-2816, 1998.
- FRY, K. L.; MEISSNER, P. S.; FALKINHAM, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Identification and use of epidemiologic markers for studies of *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v.134, p.39-43, 1986.
- FURTADO, M. R. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.340, n.2, p.1614, 1999.
- GALLO, R. C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, Washington, DC., v.224, p.500-503, 1984.

- GANGADHARAM, P. J. R. Animal models for non-tuberculous mycobacteria disease. In: SANDE, M. A. ; ZAK, O. **Experimental models in antimicrobial chemotherapy**. Orlando : Academic Press, 1986. p.1-94.
- GAYLE, H.; HILL, G. L. Global impact of human immunodeficiency virus and AIDS. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, DC., v.14, n.2, p.327-335, 2001
- GOTTEBERG, A. ; SACKS, L.; MAHALA, S.; BLUNBERG, L. Utility of blood cultures and incidence of micobacteremy in patients with suspected tuberculosis in South African infectious disease referral hospital. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, Paris, v.5, n.1, p.80-86, 2000.
- GUERRERO, C. et al. A novel insertion element from *M. avium*, IS 1245, is a specific target for analysis of strain relateness. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.33, n.2, p.304-307, 1995.
- HAROUSE, J. M. et. al. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cells lines by antibodies against galactosyl ceramide. **Science**, Washington, DC., v.253, p.320-323, 1991.
- HAVLIK, J. A et al. Disseminated *M. avium* complex infection : clinical identification and epidemiologic trends. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.165, p.55-58, 1992
- HAVLIR, D.V.; BARNES, P.F. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.340, n.5, p.367-373, 1999.
- HOFFNER, S. E.; KÄLLENIUS, G.; SVENSON, S. B. Control of disease progress in *M. avium*- infected AIDS patients. **Res. Microbiol.**, Paris, v.143, n.4, p.391-398, 1992.
- HOLT, J. G. et al. The mycobacteria. In:____. **Bergey's manual of deteminative bacteriology**. 9.ed. Baltimore : Williams and Wilkins, 1994. p.597-603
- HORSBURGH, C. R. *M. avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.324, n.19, p.1332-1338, 1991.
- HORSBURGH, C.R. et. al. Predictors of survival in patients with AIDS and disseminated *M. avium* complex disease. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.170, p.573-577, 1994.
- INDERLIED, C. B.; KEMPER, C. A.; BERMUDEZ, L. E. The *M. avium* complex. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, DC., v.6, n.3, p.266-310, 1993.
- ISBERG, R.R. Discrimination between intracelular uptake and surface adhesiønn of bacterial pathogens. **Science.**, Washington, DC., v.252, p.934-938, 1991.
- JACOBSON, M. A. *M. avium* complex. The AIDS knowledge base. Fevereiro de 1997. Disponível em: <http://hivinsite.Ucsf.edu/akb/current/06M.avium/index.html>. Acesso em 02 set. 2000.
- JACOMO, V. et. al. Isolation of blood-borne *M. avium* by using the nonradioactive Bactec 9000 MB System and comparison with a solid- culture system. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.36, n.12, p.3703-3706, 1998.

- JEKEL, F. F.; ELMORE, J. G. ; KATZ, D. L. **Epidemiologia estatística e medicina preventiva.** Porto Alegre : Artmed, 1999.
- KEMPER, C. A. et al. Treatment of *M. avium* complex bacteremia in AIDS with a four drug oral regimen: rifampin, ethambutol, clofazimine and ciprofloxacin. **Ann. Intern. Med.**, Boston, v.116, p.466-472, 1992.
- KEMPER, C. et al. Transient bacteremia due to *M. avium* complex in patients with AIDS. **Front Mycobacteriol.**, v.17. 1992.
- KIEHN, T. ; CAMMARATA, R. Laboratory diagnosis of mycobacterial infection in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.24, n.5, p.708-711, 1986.
- KIRSCHNER, P. et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination : report of a 2- year experience in a clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.31, p.2882-2889, 1993.
- KONEMAN, E. W. et al. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** 5ed. Philadelphia : Lippincott, 1997. p.893-938.
- KOVACS, J. A.; MASUR, H. Prophylaxis against opportunistic infections in patients with human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.346, n.19, p.1416-1429, 2000.
- KOX, L. F. I. et al. PCR assay based on DNA coding for 16s rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.33, n.12, p.3225-3233, 1995.
- KULSKI, J. K. et al. Use of a multiplex PCR to detect and identify *M. avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of Aids patients. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.33, n.3, p.668-674, 1995.
- KULSKI, J. K.; PRYCE, T. Preparation of mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.33, n.8, p.1985-1991, 1996.
- LEVY, J.A. et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science.**, v.225, p.840-842, 1984.
- LEVY, J. A. Infection by human immunodeficiency virus CD4 is not enough. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.335, n.20, p.1528, 1996.
- LOURO, A. P. S. et al. Direct Identification of *M. avium* complex and *Mycobacterium gordonae* from MB/BacT bottles using Accu Probe. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.39, n.2, p.570-573, 2001.
- MacGREGOR, R. R. et al. Use of PCR in detection of *M. avium* complex (MAC) bacteremia: sensitivity of the assay and effect of treatment for *M. Avium* infection on concentrations of human immunodeficiency virus in plasma. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.37, n.1, p.90-94, 1999.
- McFADDEN, J. J. et al. Epidemiological and genetic markers, virulence factors and intracellular growth of *M. avium* in AIDS. **Res. Microbiol.**, Paris, v.143, p.423-430, 1992.

- McNEIL, M. R.; BRENANN, P. J. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. **Res. Microbiol.**, Paris, v.142, n.4, p.451-463, 1991.
- METCHOCK, B. G. ; NOLTE, F. S.; WALLACE, R. J. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P. K. et al. **Manual of clinical microbiology**. 7.ed. Wasgington DC : American Society for Microbiology, 1999.p.399-439.
- MITCHELL, T.; PLATERO, B. HIV virus structure.gif. Disponível em www.media.clarkson.edu/health_topics/aises12/page3.htm> Acesso em 09.abr.2002.
- MODILESVISKY, T.; SATTLER, F. R.; BARNES, P. F. Mycobacterial disease in patients with human immunodeficiency virus infection. **Arch. Intern. Med.**, Boston, v.149, p. 2201-2205, 1989.
- MONTAGNIER, L. et al. In: GALLO, R.C.; ESSEX, M.; GROSS, L. **Human T cell leukemia lymphoma viruses**. New York : Cold Spring Harbor, 1984. P. 363
- MONTESSORI, V. et.al. Species distribution in human imunodeficiency virus-related mycobacterial Infections: implications for selection of initial treatment. **Clin. Infec. Dis.**, Chicago, v.22, p.989-992, 1996.
- MYCOBACTERIUM avium complex (MAC). Disponível em www.medlib.med.utah.edu/WebPath/jpeg2/AIDS071.jpg Acesso em 10 jun.2002.
- NIHTINGALE, S. et. al. Incidence of *M. avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus–positive patients. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.165, p.1082-1085, 1992.
- NOORDHOCK, G. T. et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.32, p.277-284,1994
- ORGANON TEKNIKA. **BacT/Alert® MB**. North Carolina,2000
- PALELLA, F. J. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, London, v. 338, .13, p.853-860,1998.
- PANTALEO, G. ; GRAZIOSI, C. ; FAUCI, S. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, London, v.328, n.5, p.1-18,1993.
- PAO, C.C. et al. d and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. **J. Clin. Microbiol.**, v.28,p.1877-1880,1990
- POONPILAS, H.; STENDER, H. ; RASMUSSEN, O. F. Evaluation of fluorescence *in situ* hybridization assay for diferentiation between tuberculosis and nontuberculosis mycobacterium species in smears of Löwenstein-Jensen and mycobacteria growth indicator tubes cultures using peptide nucleic acid probes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.39, n.3, p.1032-1035, 2001.
- RAMASWAMY, S.; MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis* :1998 update. **Tuber. Lung Dis.**, Edinburgh, v.79, p.3-29, 1998.

- RAMOS, M. C. et al. A retrospective bacteriological study of mycobacterial infections in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Brazilian J. Infec. Dis.**, v.4, n.2, p.86-90, 2000.
- REIMER, L. G.; WILSON, M.L.; WEINSTEIN, M.P. Update on detection of bacteremia and fungemia. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, DC., v.10, n.3, p.444-465, 1997.
- REUNIÃO PARA PADRONIZAÇÃO DOS EXAMES BACILOSCÓPICOS EM PACIENTES DE HANSENIASE (1 : 1986 : BAURU).
- REYN, C. F. The significance of bacteremic tuberculosis among persons with HIV infection in developing countries. **AIDS.** , v.13, p.2193-2195,1999.
- RUNYON, E. H.; SELIN, M. J.; HARRIS, H. W. Distinguishing mycobacteria by the niacin test. **Am. Rev. Tuberc.**, v. 79, p.663, 1959.
- SALTZMAN, B. R. et al. *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia in the acquired immunodeficiency syndrome. **JAMA.**, Philadelphia, v.256, n.3, p.390-391,1986.
- SCHARER, L. L. ; McADAM, J. M. **Tuberculosis and AIDS** : the relationship between *Mycobacterium* TB and the HIV type 1. New York : Springer, 1995.
- SCHLESINGER, L.S. Macrophagephagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **J. Immunol.**, v.150, p.2920-2930,1993.
- SCHÜPBACH, J.; GALLO, R. Human retroviruses. In: SPECTER, S.; HODINKA, R. L.; YOUNG, S. A. **Clinical virology manual.** , Washington DC. : ASM, 2000. p.513-560.
- SCHWARTZ, S. A.; NAIR, M. P. N. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, DC., v.6. n. 3, p.295-305, 1999.
- SELWYN, P. A. et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v 320,p.545-550, 1989.
- SEPKOWITZ. et al. Tuberculosis in the Aids era. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, DC., v.8, n.2, p.180-199, 1995.
- SHAWAR, R. M. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and isotopic hybridization methods. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v. 31, p. 61-65, 1993.
- SION, C. et al. Early identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* using the polymerase chain reaction on samples positive by a rapid commercial culture system. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.**, Wienbaden, v.18, n.5, p346-350, 1999.
- SMALL, P. M. et al. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.324, p.289-294,1991.
- SMALL, P. M.; JACOBSON, M. A. Human immunodeficiency virus and mycobacterial infections. In: SCHLOSSBERG, D. **Tuberculosis.** New York : Springer-Verlag, 1994. p.265-275.

SOINI, H ; MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clin. Chem.**, Washington, DC., v. 47, p.809-814, 2001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Normas para apresentação de documentos científicos**. 2.ed. Curitiba: Ed. da UFPR, 2000.

WALLACE, J. M.; HANNAH, J. B. *M. avium* complex infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. A clinicopathologic study. **Chest**, Northbrook, v.93, n.5, p.926-928, 1988.

WIEDBRAUK, D. L. ; WERNER, J. C.; DREVON, A. M. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.33, n.10, p.2643-2646, 1995.

WILSON, S. et al. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v.31, p.776-782, 1993.

WILEY, E.L. et al. Detection of *M. avium-intracellulare* using anti-BCG, anti-*M. duvalli*, kenyn, and Fite stas in bone marrow biopsies. Program Abstr. 8th Int. conf. AIDS. P.B146, 1992. Resumo

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not release of toxic oxigene from human phagocytes. **J. Exp. Med.**, New York, v.158, p.2016-2026, 1983.

ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Curitiba, 30 de maio de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)(s)
Sueli Massumi Nakatani
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de pesquisa intitulado " DETECÇÃO MOLECULAR DO MYCOBACTERIUM AVIUM EM AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES PORTADORES DE HIV-1", está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP-HC nº 031EXT.013/2001-05

O referido projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 29 de maio de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente



Prof. Dr. Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Serres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) O objetivo desta pesquisa é:

Detecção Molecular do *Mycobacterium avium* em amostras de sangue de pacientes com HIV-1.

Correlação entre Hemocultura e a pesquisa através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase

Caso você participe da pesquisa, será necessário coletar amostras de sangue total.

Você poderá sentir algum desconforto no momento da coleta do sangue que poderá ser através de punção venosa ou arterial.

e) Se houver necessidade de tratamento os possíveis riscos serão avaliados pelo seu médico

g) Contudo os benefícios esperados são: a identificação correta do microrganismo, e o correto direcionamento da terapêutica

h) Os médicos (nome e telefone) poderão ser contatados (local, hora), são os responsáveis pelo seu tratamento e farão o acompanhamento conforme consta no padrão ético Vigente no Brasil.

i) Está garantido todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.

h) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.

j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto , se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

k) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (como exames, etc...) não são de responsabilidade do paciente.

l) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá meu nome, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data ___/___/___

Assinatura do paciente

Nome do pesquisador

ANEXO 3 – PROTOCOLOS DE PCR

Protocolo de PCR para *Mycobacterium avium* (HAAS)

Exame n° _____ Data: ____ / ____ / ____

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____
10. _____
11. _____
12. _____

PCR Master Mix :

1^a. PCR

- | | |
|---|--|
| • 10 x tampão PCR com MgCl ₂ | 10 µl x _____ = _____ µl |
| • dNTPs | 8 µl x _____ = _____ µl |
| • Primer (NOAH-3) | 10 µl x _____ = _____ µl |
| • Primer (NOAH-5) | 10 µl x _____ = _____ µl |
| • Taq polym. (_____) | 0,5 µl x _____ = _____ µl |
| • A. dest. | 51,5 µl x _____ = _____ µl |
| • aliquotar em tubinhos de PCR | 90 µl / tubinho |
| • | 10 µl de cada amostra (5 µl contr. posit.) |

Máquina de PCR : Método „ Nr.11 „

- ← 94°C : 45 seg
- 94°C : 30 seg
- 60°C : 30 seg
- 72°C : 1 min
- ← 40 ciclos
- ← 72°C : 10 min
- ← 4°C : indef.

Gel horizontal de agarose à 1 % (10 µl amplificado, 1 µl solução tampão, 5 µl marcador molecular)

- Fragmento de DNA : 140 bp

Sequência dos Primers :

- Primer NOAH-3 : 5' - ACT TCC TGC GCA ACG TGC T - 3' (19 bases)
- Primer NOAH-5 : 5' - ATG CCG GCG ATG GTG TCG - 3' (18 bases)

Protocolo de PCR para *Mycobacterium avium* (Kulski)

Exame n° _____ Data: ____ / ____ / ____

13. _____
14. _____
15. _____
16. _____
17. _____
18. _____
19. _____
20. _____
21. _____
22. _____
23. _____
24. _____

PCR Master Mix :

1^a. PCR

- | | |
|---|--|
| • 10 x tampão PCR com MgCl ₂ | 10 µl x _____ = _____ µl |
| • dNTPs | 8 µl x _____ = _____ µl |
| • Primer (mycav-R) | 10 µl x _____ = _____ µl |
| • Primer (mycgen-F) | 10 µl x _____ = _____ µl |
| • Taq polym. (_____) | 0,5 µl x _____ = _____ µl |
| • A. dest. | 51,5 µl x _____ = _____ µl |
| • aliquotar em tubinhos de PCR | 90 µl / tubinho |
| • | 10 µl de cada amostra (5 µl contr. posit.) |

Máquina de PCR :

Método

- ← 94°C : 10 min
- ← 94°C : 30 seg
- 64°C : 45 seg
- 72°C : 45 seg
- 30 ciclos
- ← 72°C : 10 min
- ← 4°C : indef.

Gel horizontal de agarose à 1 % (10 µl amplificado, 1 µl solução tampão, 5 µl marcador molecular)

- Fragmento de DNA : 180 bp

Sequência dos Primers :

- Primer mycav-R : 5' – ACC AGA AGA CAT GCG TCT TG - 3' (20 bases)
- Primer mycgen-F : 5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3' (20 bases)

Protocolo de PCR para *Mycobacterium avium* (KULSKI)

Exame nº _____ Data: ____ / ____ / ____

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____
10. _____

PCR Master Mix :

- 10 x tampão PCR sem MgCl₂
- MgCl₂ 50 mM
- dNTPs
- Primer (Mycav-R)
- Primer (Mycgen-F)
- Taq polym. (_____)
- A. dest.
- aliquotar em tubinhos de PCR

1ª. PCR

10 µl x _____	= _____ µl
3 µl x _____	= _____ µl
8 µl x _____	= _____ µl
10 µl x _____	= _____ µl
10 µl x _____	= _____ µl
0,5 µl x _____	= _____ µl
48,5 µl x _____	= _____ µl

90 µl / tubinho

10 µl de cada amostra (5 µl contr. posit.)

Máquina de PCR : Método avium Nº 44

94°C : 10:00

62°C : 1 min

72 °C: 1min

1 ciclo

94°C : 30 seg

62°C : 1min

72°C : 1min

35 ciclos

← 94°C: 30Seg

← 62°C: 1 min

72°C : 10 min

1 ciclo

← 4°C : indef.

Gel horizontal de agarose à 1,5 % (10 µl amplificado, 1 µl solução tampão, 5 µl marcador molecular)

- Fragmento de DNA 180 bp (*M.avium*) 592bp (beta globina)

Sequência dos Primers :

- Primer mycav-R: 5'- ACC AGA AGA CAT GCG TCT TG-3'
- Primer mycgen-F: 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'