



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL
QUANTITATIVA (QPCR) PARA DIAGNÓSTICO DA
TUBERCULOSE PULMONAR EM ESCARRO DE
PACIENTES COM HIV/AIDS**

YVANA MARIA MAIA DE ALBUQUERQUE

Recife/PE

2012

YVANA MARIA MAIA DE ALBUQUERQUE

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL
QUANTITATIVA (QPCR) PARA DIAGNÓSTICO DA
TUBERCULOSE PULMONAR EM ESCARRO DE
PACIENTES COM HIV/AIDS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical

Orientadora: Prof^a Dr^a. Vera Magalhães da Silveira

RECIFE/PE

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

A345r Albuquerque, Yvana Maria Maia de.
Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (QPCR)
para diagnóstico da tuberculose pulmonar em escarro de pacientes com
HIV/AIDS / Yvana Maria Maia de Albuquerque – Recife: O autor, 2012.
96 folhas: il. ; 30 cm.

Orientador: Vera Magalhães da Silveira.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Tuberculose pulmonar. 2. HIV. 3. Raios X. 4. Tórax. 5.
Diagnóstico. I. Silveira, Vera Magalhães da (Orientador). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2012-150)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

YVANA MARIA MAIA DE ALBUQUERQUE

No dia 25 de maio de 2012, às 08h30, na Sala de Aula do PPGMEDTROP da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: a Prof^ª. Dr^ª. **Maria Amélia Vieira Maciel** (Presidente da Banca - UFPE), a Prof^ª. Dr^ª. **Ana Catarina de Souza Lopes** (UFPE), o Prof. Dr. **Antônio Roberto Leite Campêlo** (UFPE), a Prof^ª. Dr^ª. **Marília Montenegro Cabral** (UPE) e a Prof^ª. Dr^ª. **Líbia Cristina Rocha Vilela Moura** (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda **YVANA MARIA MAIA DE ALBUQUERQUE** sobre a sua Tese intitulada “**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (QPCR) PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR EM ESCARRO DE PACIENTES COM HIV/AIDS**”, a qual foi orientada pela Prof^ª. Dra. **Vera Magalhães da Silveira** (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. **Maria Amélia Vieira Maciel**

Aprova da

Prof^ª. Dr^ª. **Ana Catarina de Souza Lopes**

APROVADA

Prof. Dr. **Antônio Roberto Leite Campêlo**

Aprova

Prof^ª. Dr^ª. **Marília Montenegro Cabral**

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. **Líbia Cristina Rocha Vilela Moura**

APROVADA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Gláucia Maria Assis Costa

À memória do meu pai José Pacheco e do meu querido irmão e amigo José Pacheco Jr.

Aos meus familiares pelo incentivo, em especial, à minha mãe Terezinha Vera, que com seu amor sempre me apoiou em todas as etapas de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Vera Magalhães, pela amizade, orientação competente, apoio, dedicação e incentivo constante, indispensáveis à realização deste trabalho.

Ao Prof^o Marcelo Magalhães, pelo apoio recebido para realização e revisão das técnicas laboratoriais.

Aos colegas radiologistas: Eolo Albuquerque Filho e Ana Carolina Brandão pelo apoio recebido na avaliação das radiografias de tórax.

À Ana Kelly Lins do Setor de Biologia Molecular e Verônica Pereira do Setor de Bacteriologia do Laboratório Marcelo Magalhães.

Ao Prof^o Edmilson Mazza pela orientação na análise estatística.

À Giseani Bezerra, bibliotecária da UFPE, pela revisão das referências bibliográficas.

Ao corpo docente da Pós-graduação em Medicina Tropical da UFPE, pela contribuição na minha formação profissional.

A Walter Galdino secretário da pós-graduação em Medicina Tropical.

RESUMO

ALBUQUERQUE, Yvana Maria Maia. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa (qPCR) para Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar em Escarro de Pacientes com HIV/aids. ----96f. Tese de Doutorado em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco.

O diagnóstico da tuberculose apresenta dificuldades em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os doentes coinfectados HIV/*M.tuberculosis* (MTB) nos estágios mais avançados de imunocomprometimento apresentam manifestações clínicas atípicas e o exame direto, rotineiramente utilizado, tem baixa sensibilidade. A cultura apesar de ter maior sensibilidade fornece resultados tardios. Evidencia-se nesta população a necessidade de testes diagnósticos mais eficientes. A tese será apresentada no formato de dois artigos científicos. No primeiro, estudou-se a utilidade da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) para diagnóstico da tuberculose pulmonar em escarro de pacientes com HIV/aids. No segundo, descreveu-se as alterações radiográficas do tórax de pacientes com tuberculose pulmonar confirmado por cultura de escarro. Foram incluídos no estudo 140 pacientes com HIV/aids e suspeita clínica de tuberculose pulmonar, atendidos no período de agosto de 2009 a janeiro de 2012, em dois hospitais de referência para atendimento de pacientes infectados pelo HIV em Recife-PE. Coletou-se uma amostra de escarro de cada paciente, e caso não houvesse escarro suficiente, realizou-se nebulização com solução salina para indução do escarro. O padrão ouro do estudo foi à cultura realizada em meios Löwenstein-Jensen e 7H9. A cultura e a qPCR para tuberculose foram realizadas em laboratório privado situado no Recife. Dos 140 pacientes em 47 (33,6%), diagnosticou-se tuberculose pulmonar pelo padrão ouro. A sensibilidade, especificidade e acurácia da qPCR foram respectivamente 87,2%, 98,9% e 95%. Foram realizados exames radiográficos do tórax em 42 pacientes coinfectados com cultura de escarro positiva, que foram avaliados por dois radiologistas experientes. A alteração radiológica isolada mais frequente observada foi a consolidação parenquimatosa, que acometeu seis (14,3%) dos pacientes, seguida pelo infiltrado intersticial e micronodular difuso, além da associação infiltrado e consolidação. Concluiu-se que a qPCR realizada no escarro de pacientes coinfectados HIV/MTB apresentou boa sensibilidade, especificidade e acurácia, sendo útil no diagnóstico de tuberculose pulmonar nesses pacientes. Com relação aos achados radiográficos de tórax, estes demonstraram ser de pouco auxílio no diagnóstico da tuberculose pulmonar nos coinfectados, exceto quando o padrão cavidade e infiltrado micronodular difuso estão presentes

Palavras chave: tuberculose pulmonar, HIV/aids, PCR em tempo real, RX tórax, diagnóstico.

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Yvana Maria Maia. Quantitative Real Time PCR (Q-PCR) for Sputum Smear Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis among People living with AIDS. ---96p. Tese de Doutorado em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco.

Tuberculosis' diagnosis is difficult in HIV soropositive patients. The patients co-infected HIV/*M.tuberculosis* (MTB) in severe immune deficiency stage present atypical clinical manifestation and direct sputum smear, usually used, shows low sensitivity. The culture, despite better sensitivity, obtains later results. The thesis will be presented in form of two articles. In the first, it has studied the utility of quantitative real time PCR for tuberculosis' diagnosis among AIDS patients' sputum smear. In the second, it has been described the major thoracic radiographic alterations among AIDS patients' and pulmonary tuberculosis confirmed by sputum culture. A total of 140 HIV/AIDS patients were included in the study, with clinical suspicion of pulmonary tuberculosis, from August 2009 to January 2012, were attended at two referral hospitals for HIV/AIDS in Recife-PE. A sputum sample was collected from each patient, and if they were unable to produce spontaneous sputum, they were saline nebulized, for sputum induction. The culture, in Löwenstein-Jensen solid medium and 7H9, was the gold standard. The culture and qPCR for tuberculosis have been done in a private laboratory in Recife-PE. From all the 140 studied patients, 47 (33,6%) pulmonary tuberculosis was diagnosis by gold standard. The sensitivity, specificity and accuracy were 87,7%, 98,9% and 95% respectively. There were evaluated chest X-rays from 42 co-infected HIV/MTB patients with positive culture by two experienced radiologists, the most common radiological alteration was parenchymal consolidation, encountered in six (14,3%) patients, followed by interstitial infiltrate, difuse micronodular (military) pattern an association between interstitial infiltrate and parenchymal consolidation. It was concluded that qPCR, has given a good sensitivity, specificity and accuracy and it can be recommender for use in the management of HIV/AIDS patients. However, thoracic radiographic findings were not specific and thorax RX is not sufficient in itself to establish a pulmonary tuberculosis diagnosis in co-infected HIV/MTB patients, except when cavity and micronodular pattern are presented.

Key-words: pulmonary tuberculosis, HIV/AIDS, real time PCR, chest RX, diagnosis.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 - PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para diagnóstico da tuberculose pulmonar em escarro de pacientes com aids.

Tabela 1 – Comparação entre dois meios de cultura utilizados para diagnóstico de TBP em escarro de pacientes coinfectados com HIV.

Tabela 2 – Comparação entre a qPCR e exame direto com os resultados da cultura (Padrão ouro): sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (A).

Artigo 2 - Avaliação radiográfica do tórax de pacientes com HIV/aids e tuberculose pulmonar.

TABELA 1 – Principais manifestações clínicas apresentadas por 42 pacientes coinfectados com HIV/TB.

TABELA 2 – Achados radiográficos em 42 pacientes coinfectados HIV/TB.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

BAAR: Bacilo álcool-ácido resistente

CV: carga viral do HIV

DNA: ácido desoxirribonucléico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HCP: Hospital Correia Picanço

HC: Hospital das Clínicas

LBA: lavado broncoalveolar

LACEN: Laboratório Central

LJ: Lowenstein-Jensen

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

NAA: amplificação do ácido nucleico

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pannamericana da Saúde

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa

SES: Secretaria Estadual da Saúde

TB: tuberculose

TBP: tuberculose pulmonar

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TARV: Terapia antirretroviral

UNAIDS: United Nations Programme on HIV/AIDS.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Desenho do Estudo	23
4.2. Local do Estudo	23
4.3. População do Estudo	24
4.3.1. Critérios de Inclusão	24
4.3.2. Critérios de Exclusão	25
4.4. Categorização das Variáveis	25
4.4.1. Padrão Ouro	25
4.4.2. Técnica de PCR em Tempo Real Quantitativa	25
4.4.3. Variáveis para Caracterização da Amostra	26
4.5. Operacionalização da Pesquisa	27
4.5.1. Avaliação de Critérios Clínicos e Epidemiológicos	27
4.5.2. Avaliação Radiográfica do Tórax	27
4.5.3. Técnica Laboratorial	27
4.5.4. Cultura para Micobactéria	28
4.5.5. Técnica de PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR)	29
4.6. Considerações Éticas	30
4.7. Análise Estatística	30
4.7.1. Definição do Tamanho da Amostra	30
4.7.2. Métodos Estatísticos	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Artigo 1 – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa (qPCR) para diagnóstico da tuberculose pulmonar em escarro de pacientes com aids.	32
5.2. Artigo 2 - Avaliação radiográfica do tórax de pacientes com HIV/aids e tuberculose pulmonar.	43

6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE A – Questionário da Pesquisa	61
APÊNDICE B – Métodos Laboratoriais	63
APÊNDICE C – Termo de Consentimento e Livre Esclarecimento	65
APÊNDICE D – Artigo 1 em Inglês	68
APÊNDICE E – Artigo 2 em Inglês	79
ANEXO A – Artigo 3	90
ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética	96

1. APRESENTAÇÃO

A interação entre a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) evidenciada com a pandemia da aids favoreceu o recrudescimento da tuberculose (TB) nos países desenvolvidos, outrora sob controle. Agravou ainda o difícil panorama desta enfermidade, com substancial aumento do número de casos novos nos países em desenvolvimento (GOPI et al., 2006).

A TB é uma das infecções oportunistas mais comuns nos pacientes com aids, particularmente nos países onde a mesma é endêmica, como o Brasil. O risco anual de progressão para TB-doença entre os pacientes coinfectados varia entre cinco e 15%, dependendo do grau de imunodepressão, contra 0,5% e 1% nos não coinfectados (MELO et al., 2009).

O diagnóstico da TB nos pacientes com aids é difícil. As técnicas laboratoriais convencionais utilizadas, como o exame de escarro corado pelo Ziehl-Neelsen, apesar do baixo custo, apresenta baixa sensibilidade, detectando apenas 30-60% das culturas positivas nos doentes com suspeita clínica de TB (CLEEFF et al., 2005). O exame radiológico do tórax apresenta-se freqüentemente atípico (SCHERER, SPERHACHE, JARCZEWSKI, et al. 2011). A cultura apesar de ter maior sensibilidade, variando de acordo com os diferentes artigos entre 19 e 96% entre HIV soropositivos, método padrão ouro, apresenta resultados tardios, de quatro a oito semanas (MELO et al., 2009; PADMAPRIYADARSINI; NARENDRAN; SWAMINATHAN, 2011; REWATA et al., 2009).

Estudos têm sugerido o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como método auxiliar no diagnóstico de diversas doenças infecciosas, inclusive a TB (Lemaitre et al. 2004, Ortu et al. 2006). A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) apresenta maior vantagem em relação a tradicional, pois dispensa a etapa de eletroforese em gel. Desse modo, é uma técnica, mais rápida, sensível, menos dispendiosa e com menor risco de contaminação do ambiente quando comparada à PCR tradicional (FARAH, 2007; KIM et al., 2010). Além disso, é um teste quantitativo, isto é, capaz de determinar o número de cópias do DNA de interesse. (GIULIETTI et al., 2001).

A tuberculose pulmonar (TBP) necessita de diagnóstico rápido e efetivo, para que medidas de controle da doença sejam tomadas, como a instituição precoce da terapia antituberculose. Isso minimiza os riscos de complicações, e conseqüentemente, a necessidade de hospitalização, o que é comum aos pacientes coinfectados pelo HIV/MTB. Além disso, há redução de transmissibilidade da doença (ORTU et al, 2006; KUMAR et al., 2010; SCHERER et al., 2011). Em populações com alta prevalência de coinfeção HIV/MTB é evidente a necessidade de testes diagnósticos mais eficientes para controle desta enfermidade (KIVIHYA-NDUGGA et al., 2004; SCHERER et al., 2011).

Diante do exposto, o presente estudo se propõe no primeiro artigo avaliar a qPCR realizada em amostra de escarro para diagnóstico da TBP, utilizando a cultura em meios de Lowenstein-Jensen e 7H9 como padrão ouro e em um segundo artigo avaliar as alterações radiográficas do tórax de pacientes com HIV/aids e TBP, confirmada através da cultura de escarro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

AIDS E TUBERCULOSE PULMONAR: ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente etiológico da aids, constitui sério problema de Saúde Pública em todo o mundo. Segundo dados da UNAIDS (United Nations Programs on HIV/AIDS) existem no mundo 34 milhões de pessoas infectadas com HIV/aids, estas cifras correspondem à prevalência de 1% dos indivíduos na faixa etária de 15-49 anos (UNAIDS, 2010).

A aids é a principal causa de óbito na África subsaariana, que detem aproximadamente dois terços do total mundial, ou seja, 25,3 milhões de pessoas infectadas com o HIV, desses, três quartos são do sexo feminino (UNAIDS, 2010).

Na América Latina, o relatório da UNAIDS afirma que a epidemia permanece estável. Em 2009, o número estimado de novas infecções na região foi de 92 mil, com 58 mil óbitos. Atualmente, estima-se que 1,6 milhões de pessoas vivam com aids nesta região (UNAIDS, 2010).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde até 2011 a epidemia de aids, registrou 608.230 casos, com 241.469 óbitos (RAMALHO, 2011). No Estado de Pernambuco, dados do Programa Estadual DST/AIDS, registraram 16.961 casos acumulados de aids, no período compreendido entre 1983-2011 (BOLETIM DST/AIDS-PE, 2012).

A infecção pelo HIV predispõe a profundos e progressivos efeitos sobre o sistema imunológico, determinando alterações em praticamente, todo o organismo. A imunodeficiência apresentada pelos doentes na fase mais avançada da infecção configura o quadro de aids, caracterizando-se pelo aparecimento de graves infecções bacterianas, fúngicas, parasitárias e virais. Dentre as infecções bacterianas, pode-se destacar a tuberculose (TB), causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), que é apontada como uma das complicações mais comuns no curso da infecção pelo HIV (RACHID; SCHERTER, 2008).

O MBT, é uma bactéria aeróbia delgada, em forma de bastonete, não formadora de esporos, que mede 0,5µm por 3µm, apresenta crescimento lento. É o agente mais importante da doença humana causada pelo complexo MTB, este complexo engloba ainda, o *M.bovis* (bacilo da TB bovina e responsável pela TB transmitida pelo leite não pasteurizado), *M.caprae* (relacionado ao *M.bovis*),

M.africanum (isolado de casos na África Ocidental, Central e Oriental), o *M.microti* (bacilo do “rato calunga”, um micro-organismo menos virulento e raramente encontrado), *M.pinnipedii* (bacilo que infecta focas e leões-marinhos no hemisfério sul, e recentemente seres humanos) e *M.canetti* (isolado raro de casos da África Oriental que produz colônias lisas incomuns em meio sólido) (RAVIGLIONE; BRIEN, 2008).

A TB constitui sério problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que um terço da humanidade seja infectada pelo MTB, com mais de nove milhões de casos novos e 1,8 milhões de mortes por ano em decorrência da doença, ocorrendo 5000 óbitos a cada dia em consequência desta enfermidade (WHO, 2011).

As infecções por outras espécies de micobactérias também deve ser considerada. Segundo a Organização Pan-Americana de saúde (OPAS) e a OMS, 7000 casos novos de TB humana causada pelo *M.bovis* são notificados na América do Sul a cada ano. A diferenciação entre o MTB e *M.bovis* é particularmente importante, já que este último é resistente à pirazinamida, droga usada no tratamento da TB (PINTO JÚNIOR et al., 2007).

No Brasil, é evidente o recrudescimento da TB, relacionada à falta de sistemas públicos de saúde eficazes, déficit nos programas de controle dessa enfermidade, crises econômicas sucessivas, crescimento da população marginalizada urbana e rural, aumento das migrações e epidemia da aids (LIMA et al., 2008).

No Estado de Pernambuco foram registrados 4.698 casos novos de TB em 2011, destes 8,4% coinfectados com o HIV, constituindo a segunda causa de infecção associada à aids. (BOLETIM DST/AIDS-PE, 2012).

A infecção pelo HIV e sua interação com o MTB evidenciou uma modificação no perfil da TB com substancial aumento dos casos novos nos países em desenvolvimento, como o Brasil e o recrudescimento da doença nas nações desenvolvidas, outrora sob controle (GOPI et al., 2007). Ademais, a deterioração social observada especialmente nos países em desenvolvimento, contribui para o incremento desta enfermidade (KIVIHYA-NDUGGA et al., 2004). Ressalta-se que 90% dos casos de TB ocorrem em países em desenvolvimento (PINTO JÚNIOR et al., 2007).

ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA COINFECÇÃO HIV/MTB

A coinfeção HIV/MTB tem sido motivo de grande preocupação, devido ao incremento da morbimortalidade relacionada à progressão da infecção pelo HIV (SCHIJMAN et al., 2004).

O mecanismo de resposta imune-protetora do hospedeiro em relação ao MTB depende da capacidade de mobilização de linfócitos T, da categoria CD₄ e destes reconhecerem os antígenos bacilares e da interação destes com o macrófago, inibindo, assim, a multiplicação bacilar no interior das células, com conseqüente formação de lesão granulomatosa (MELO et al., 2009).

A infecção pelo HIV produz uma disfunção progressiva do sistema imune, comprometendo, principalmente, a imunidade celular mediada pelos linfócitos T CD₄, tornando estas células incompetentes na defesa contra o micro-organismo. A depleção e a disfunção dos linfócitos T CD₄ são marcadores de infecção pelo HIV e a principal causa da imunodeficiência. A TB acelera a infecção pelo HIV por vários mecanismos, entre eles, a produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF) alfa estimulador de replicação viral (MELO et al., 2009).

ASPECTOS CLÍNICOS E RADIOLÓGICOS DA TBP EM PACIENTES COM AIDS

A tuberculose pulmonar (TBP) pode ocorrer em pacientes previamente assintomáticos e com elevadas contagens de linfócitos T CD₄, nestes casos, em geral clinicamente se apresenta na forma clássica, com lesão cavitária no ápice pulmonar (RACHID; SCHECHTER, 2008).

Em pacientes com aids e imunodeficiência avançada, a TBP apresenta manifestações clínicas atípicas, por vezes semelhantes à primo-infecção. A radiografia de tórax demonstra infiltrado intersticial difuso ou miliar, adenomegalias hilares e mediastinais, além de freqüente comprometimento de outros órgãos. A presença de derrame pleural é relativamente comum, sendo o líquido pleural serofibrinoso, com predomínio de linfócitos (RACHID; SCHECHTER, 2008).

Clinicamente, em geral, o início é insidioso, com tosse produtiva, febre vespertina, sudorese noturna, queda progressiva do estado geral, com emagrecimento acentuado. A dispnéia ocorre mais frequentemente nas fases mais

avançadas. A associação com candidíase oral é comum. Entretanto, os pacientes com grave comprometimento imune apresentam a forma disseminada da doença. Ressalte-se que outros agentes etiológicos podem apresentar manifestação clínica semelhante, principalmente as infecções fúngicas, clinicamente indistinguível da TB disseminada (RACHID; SCHECHTER, 2008).

A TB extrapulmonar apresenta o dobro da incidência nos pacientes coinfectados com o HIV. Nestes doentes, a TB ganglionar é a forma mais comum de comprometimento extrapulmonar. Clinicamente caracteriza-se pelo aumento dos gânglios, sobretudo da cadeia cervical. No início estes são indolores e móveis. Com a evolução da doença, podem coalescer, formando uma massa que se torna aderente aos planos superficiais e profundos. Sem tratamento essa massa fistuliza, drenando material seroso ou purulento. O diagnóstico é realizado através de punção-biopsia, obtendo-se material para cultura e exame histopatológico (GOPI et al., 2007).

A TB pleural constitui a segunda forma de TB extrapulmonar nos pacientes com aids. A incidência de derrame pleural em doentes com HIV/aids é mais comum nos pacientes com CD₄ elevado. Clinicamente, os sintomas pulmonares se associam a uma incidência maior de disseminação da doença. O exame do líquido pleural é necessário para o diagnóstico (GOPI et al., 2007).

DIAGNÓSTICO DA TBP EM PACIENTES COINFECTADOS HIV/MTB

O diagnóstico da TBP nos pacientes coinfectados com o HIV é difícil de ser estabelecido. O exame direto de escarro (BAAR), utilizado rotineiramente tem baixa sensibilidade, a cultura, apesar de mais sensível os resultados só são obtidos em média com seis semanas (SCHIJMAN et al., 2004). Além disso, observa-se principalmente nos pacientes com imunodeficiência avançada dificuldade na expectoração de escarro espontâneo, podendo a indução do escarro (IE) favorecer significativamente o resultado do BAAR (REWATA et al., 2009).

Em estudo realizado em Malawi com objetivo de examinar o valor da IE para detectar casos de tuberculose, foram analisados a IE de 82 adultos, os quais haviam produzido escarro negativo ou não produziram escarro. A IE foi examinada para exame direto e cultura para micobactérias. A IE foi satisfatória em 73 dos 82 pacientes estudados (26 previamente negativos e 47 sem produção de escarro) e

concluem que esta técnica é útil para melhorar a detecção de escarros positivos em pacientes com TB (PARRY et al., 1995).

Em outra pesquisa realizada no Brasil (Rio de Janeiro), com objetivo de comparar os resultados de IE com a fibrobroncoscopia em pacientes com suspeita clínica de TB e sem produção de escarro, em região com alta prevalência de infecção pelo HIV. Dos 251 pacientes estudados, 143(57%) tiveram o diagnóstico de TBP, destes 17% eram HIV positivos. Não se observou diferença estatisticamente significativa no resultado do exame direto e cultura, obtidos por IE ou broncoscopia. Entre os pacientes HIV soropositivos a concordância entre o exame direto e cultura foi de 98% (teste de Kappa=0,93). Concluem que a IE é um método seguro com concordância semelhante à broncoscopia para diagnóstico da TBP (CONDE et al., 2000).

Ressalte-se que a identificação precoce do MTB nos pacientes com aids, além de reduzir o risco das formas disseminadas da doença, que exigem hospitalização, promovem também, uma diminuição do risco de transmissão, com conseqüente instituição precoce da terapêutica (SCHIJMAN et al., 2004; SCHERER et al., 2011).

DIAGNÓSTICO DA TBP ATRAVÉS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Na última década, com os avanços nas técnicas de Biologia Molecular, vários métodos de amplificação do ácido nucléico (NAA) foram desenvolvidos para identificar o MTB em espécimes clínicos; entretanto, as técnicas de NAA não demonstraram sensibilidade semelhante à da cultura, além de evidente possibilidade de contaminação, gerando resultados falsos positivos. Este inconveniente foi contornado pelo desenvolvimento das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa (qPCR), utilizada na detecção do DNA de variados micro-organismos, inclusive o do MTB (LEMAITRE et al., 2004).

A qPCR é uma técnica que utiliza sondas marcadas com fluoresceína, a qual é liberada durante a amplificação do DNA. Isso permite monitorar a reação enquanto os ciclos se sucedem e detectar o produto da amplificação à medida que este está sendo formado, dispensando a posterior etapa de eletroforese em gel. A visualização da reação se faz por meio de gráficos que refletem a quantidade de

fluorescência liberada, quando as sondas marcadas com corante fluorescente vão sendo consumidas durante a reação (FARAH, 2007).

Dentre os vários modelos de sondas fluorescentes, a mais prática, especialmente porque permite os desenhos *in house* é a TaqMan®. Esta variedade utiliza a atividade exonucleásica 5'-3' da Taq® DNA polimerase. Esta enzima digere a extremidade 5' da sonda marcada que anela especificamente com a parte interna do segmento de DNA a ser amplificado entre os dois "primers". Na extremidade 3' há um inibidor da fluorescência ou "quencher". Quando a PCR progride, a extremidade 5' da sonda é afastada do "quencher", o efeito inibidor é perdido e a fluorescência é liberada. A fluorescência emitida é captada em dispositivo apropriado, permitindo a construção de uma curva que demonstrará a quantificação do DNA molde, isto é, o segmento de DNA pesquisado presente inicialmente no sistema (FARAH, 2007).

Lemaitre et al., estudaram 100 espécimes clínicos coletados de 93 pacientes hospitalizados com objetivo de comparar as técnicas de qPCR e o Teste Direto para Amplificação do *M.tuberculosis* (AMTD) Gen- Probe, San Diego, Califórnia para diagnóstico da TB. Obteve-se uma sensibilidade de 90% e 80%, especificidade de 100%, valores preditivos negativos de 96% e 92% e positivo de 100% para qPCR para MTB em espécimes respiratórias e não respiratórias respectivamente. O AMTD demonstrou uma sensibilidade de 80% e 70%, especificidade de 100%, valores preditivos negativos de 92% e 89% e valores preditivos positivos de 100% para espécimes respiratórios e não respiratórios respectivamente (LEMAITRE et al. 2004).

Em pesquisa realizada por Kivihya-Ndugga et al. (2004), com objetivo de comparar a PCR (AMPLICOR PCR system), com o método direto de coloração de Ziehl-Neelsen e exame radiológico de tórax em população com alta prevalência de infecção pelo HIV, em clínica de referência de tratamento de TB no Kenia. Estudaram-se amostras de escarro de 1396 pacientes com suspeita clínica de TB. As amostras de escarro foram analisadas para o MTB pela PCR, o padrão ouro utilizado foi à cultura pelo meio Löwenstein-Jensen. Todas as culturas foram genotipadas para identificar as espécies de micobactéria. A sensibilidade e especificidade da PCR foi 93% e 84%, respectivamente. A coinfeção com o HIV não afetou a sensibilidade da PCR. A PCR detectou o MTB em 11,7% das culturas negativas. A sensibilidade da baciloscopia foi significativamente mais baixa nos HIV

positivos, com 44%, contra 63% nos não coinfetados. Os autores concluem que a PCR poderia ser utilizada para diagnóstico da TBP, entretanto, estudos de custo-efetividade são necessários para embasar a evidência da utilidade desta técnica no controle da TB (KIVIHYA-NDUGGA et al., 2004).

Em outro estudo realizado por Kibiki et al. (2007) com objetivo de verificar a contribuição da qPCR para diagnóstico da TBP no lavado broncoalveolar (LBA) em pacientes coinfetados com HIV na Tanzânia. Estudou-se 120 pacientes HIV positivos com infecção respiratória e realizou-se baciloscopia no escarro e LBA, cultura de escarro para MTB, qPCR e teste sorológico. O padrão ouro utilizado foi à cultura do LBA. Concluíram a baixa sensibilidade da baciloscopia e sorologia, com 66,7% e 0% respectivamente. A qPCR mostrou melhores resultados com sensibilidades de 85,7% e 96,4% com CTs (thresholds cycle) de 32 e 40, sugerem que mais estudos são necessários para avaliar a aplicação da qPCR, tanto no escarro, quanto no LBA para diagnosticar a TBP (KIBIKI et. al., 2007).

Em estudo realizado no Brasil, com objetivo de comparar quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da TBP, foi realizada pesquisa direta pelas colorações Ziehl-Neelsen e auramina, cultura para micobactérias pelo meio Löwenstein-Jensen e PCR (Amplicor®) para o MTB em 160 amostras respiratórias de pacientes com suspeita de TBP. Coletou-se uma amostra para cada paciente. Dos 160 doentes, 142 foi diagnosticada TBP de acordo com a cultura, padrão ouro do estudo. As técnicas de Ziehl-Neelsen e auramina, cultura e PCR apresentaram sensibilidades de 54,2%, 58,4%, 67,6% e 77,5%, respectivamente. A especificidade dos quatro métodos foi de 100%. A sensibilidade da PCR foi 50,8% nas amostras com baciloscopia negativa e de 98,8% naqueles com baciloscopia positiva e concluem que a PCR é um método promissor no diagnóstico da TBP, mesmo em amostras paucibacilares (LIMA et al., 2008).

Em pesquisa realizada no sul do Brasil com objetivo de avaliar dois métodos de PCR "in house": a PCR dot-blot e a PCR visualizada em gel de agarose (AG) para diagnóstico da TBP em pacientes HIV soropositivos e negativos. Estudou-se 277 pacientes com suspeita clínica de TBP, destes 74 soropositivos para o HIV. Foi coletada uma amostra de escarro de cada paciente. O padrão ouro do estudo foi à cultura em meio Löwenstein-Jensen e avaliação clínica realizada por pneumologistas. Considerou-se como critério de diagnóstico nos pacientes com cultura negativa, a clínica, fatores de risco e radiografia de tórax. Observou-se que o

fator mais consistente para o diagnóstico de TBP foi a radiografia torácica (R:0,36; $p < 0,05$), entretanto, em doentes soropositivos este fator não foi significativo (R:0,85; $p = 0,32$). Os achados radiográficos clássicos de TBP foram observados freqüentemente em soronegativos (67,3%), enquanto em HIV positivos as lesões fibro-cavitárias acometeram apenas 32,3% dos doentes. A sensibilidade da PCR dot-blot e PCR AG no escarro foi respectivamente 74% e 43%. Concluem que a PCR dot-blot parece mais apropriada para uso na rotina de diagnóstico da TBP (SCHERER et.al., 2011).

Diante da dificuldade de diagnosticar a TBP em pacientes com HIV/aids e a carência de estudos que avaliem a qPCR no Brasil, este estudo se propõe no primeiro artigo a avaliar a utilidade da qPCR em amostra de escarro de doentes com aids e suspeita clínica de TBP, utilizando a cultura como padrão ouro e no segundo artigo descrever as alterações radiográficas do tórax dos pacientes com TBP confirmada pela cultura.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a PCR em tempo real quantitativa realizada em amostra de escarro para diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com HIV/aids.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia da PCR em tempo real quantitativa realizada em amostras de escarro para diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com HIV/aids, utilizando-se como padrão ouro, as culturas em meios de Lowestein Jensen e 7H9 .

Determinar a acurácia da PCR em tempo real em relação à contagem das células T CD₄.

Determinar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia do exame direto corado pela técnica Ziehl-Neelsen.

Descrever as alterações radiográficas do tórax de pacientes com HIV/aids e tuberculose pulmonar confirmada pela cultura de escarro.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo quantitativo de acurácia de teste diagnóstico realizado em pacientes infectados com o HIV, atendidos em dois hospitais de referência para atendimento HIV/aids, em Recife. O estudo partiu da Fase III, na qual o teste visa distinguir pacientes com ou sem TB, entre indivíduos com aids suspeitos de apresentarem TB.

O padrão-ouro adotado no estudo foi à cultura para MTB realizada a partir de amostra de escarro, utilizando-se os meios de Löwestein-Jensen e o meio líquido 7H9 (bactec).

Para garantir o cegamento necessário ao tipo e fase do estudo de validação, os exames foram realizados e analisados de forma independente pelos profissionais envolvidos na pesquisa.

Estudos têm sugerido o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como método que poderia auxiliar no diagnóstico da TBP. A qPCR é uma técnica mais rápida, sensível e reprodutível quando comparada à PCR tradicional (FARAH, 2007).

4.2. LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Hospital Correia Picanço (HCP) e Hospital das Clínicas (HC/UFPE), unidades de referência para atendimento de pacientes com HIV/aids em Recife.

HC/UFPE: Hospital universitário, que atende em média 20% dos casos de aids do estado de Pernambuco, realiza atendimentos de alta complexidade.

HCP: Hospital de referência para atendimento de pacientes HIV/aids da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, presta atendimento a nível ambulatorial com equipe multidisciplinar, internamento, emergência e UTI, com atendimento de 50% dos casos de aids do estado.

A qPCR, a cultura e o exame direto foram realizados no Laboratório Marcelo Magalhães, laboratório da rede privada localizado na cidade do Recife, que realiza cerca de 15.000 exames mensais na área de bacteriologia e biologia molecular, apresenta certificado da Control Lab, da Sociedade Brasileira de Análise Clínica.

Os exames de CD₄ e carga viral (CV) para o HIV foram realizados no Laboratório Central do Estado (LACEN).

Os exames de rotina e radiografia do tórax foram realizados nos hospitais envolvidos na pesquisa.

4.3. POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes infectados pelo HIV, com suspeita clínica de TBP atendidos no Serviço de Doenças Infecciosas (DIP), HC/UFPE e Hospital Correia Picanço (HCP) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco (SES/ PE) no período de agosto de 2009 a janeiro de 2012.

4.3.1. Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo os indivíduos que apresentaram sorologia positiva para o HIV, realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígenos obtidos pela técnica de DNA recombinante (ABBOTT Laboratories, Chicago II), que tiveram a infecção confirmada através de outra técnica como a imunofluorescência ou western-blot para o HIV (de acordo com a Portaria nº 59 do Ministério da Saúde de 29/01/03). Os pacientes infectados com o HIV que apresentaram suspeita de TBP (definida como: tosse e febre há pelo menos 15 dias) foram os casos. Os pacientes poderiam ou não estar em uso de terapia antirretroviral (TARV). A idade mínima dos pacientes envolvidos no estudo foi 18 anos.

4.3.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo, pacientes em tratamento com drogas antituberculose no momento da coleta e aqueles sem condições clínicas de fornecerem a amostra de escarro necessária ao estudo.

4.4. CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

4.4.1. Padrão Ouro

O padrão ouro adotado no presente estudo foi à cultura para MTB realizada a partir de amostra de escarro. Foram utilizados os meios de Löwestein-Jensen e o meio líquido 7H9. Foi considerado padrão ouro positivo quando pelo menos um dos meios de cultura foi positivo.

4.4.2. Técnica de PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR)

Esta técnica permite monitorar a reação de PCR enquanto os ciclos se sucedem e detectar o produto da amplificação à medida que ele está sendo formado, dispensando a etapa de eletroforese em gel. O sistema é baseado na detecção e quantificação de um corante fluorescente, cujo sinal aumenta em proporção direta à quantidade de fragmentos amplificados na reação de PCR. A visualização da reação se faz por meio de sondas marcadas com corante fluorescente, conhecida como TaqMan®, este sistema apresenta alta especificidade, ligando-se somente ao produto da PCR. A fluorescência emitida permitirá a construção de uma curva que demonstrará a quantificação do DNA bacteriano, registrada em um computador acoplado ao aparelho (FARAH, 2007).

4.4.3. Variáveis para Caracterização da Amostra

Idade, sexo, carga viral para o HIV, contagem de linfócitos TCD₄, categoria de exposição e município de residência.

a) **Idade** – será categorizada em 2 grupos:

- 1) 20 – 30 anos
- 2) 31 ou mais

b) **Sexo** – será categorizado como: **masculino e feminino**

c) **Medida da carga viral para o HIV** – será categorizada em 3 grupos:

- 1) < 5.000 cópias/ml
- 2) 5.000 a 100.000 cópias/ml
- 3) > 100.000 cópias/ml

d) **Contagem de CD₄** – será categorizado em 3 grupos:

- 1) < 200 mm³
- 2) 200 ou mais
- 3) Não informado

e) **Categoria de exposição** – será categorizada em 7 grupos:

- | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| 1) H (Homossexual) | 5) TS (Hemotransfundidos) |
| 2) B (Bissexual) | 6) PS (Profissional de Saúde) |
| 3) HT (Heterossexual) | 7) D (Desconhecido) |
| 4) UDI (Usuário de Drogas Injetáveis) | |

f) **Município de Residência** – será categorizada em 2 grupos:

- 1) Recife
- 2) Outros Municípios (neste caso deverá ser especificado qual)

4.5. OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

4.5.1. Avaliação de Critérios Clínicos e Epidemiológicos

Os dados clínicos, laboratoriais, terapêuticos e as características epidemiológicas foram coletados através de avaliação do paciente e análise do prontuário e preenchidos em formulário específico da pesquisa (Apêndice A).

4.5.2. Avaliação Radiográfica do Tórax

As radiografias de tórax foram realizadas antes do início do tratamento antituberculose, utilizando-se as incidências pósterio-anterior e perfil. As radiografias de tórax foram definidas em normais e anormais. Os exames anormais foram classificados em infiltrado intersticial, consolidação parenquimatosa, adenopatia hilar e/ou mediastinal, cavidade, infiltrado micronodular difuso (miliar) e derrame pleural, além da associação de duas ou mais destas alterações. Os exames radiográficos foram analisados de forma independente por dois radiologistas, com mais de 20 anos de experiência em radiografia torácica, que forneceram os laudos sem terem conhecimento da situação clínica e resultado dos exames laboratoriais dos pacientes. Nos casos discordantes o resultado foi definido por consenso.

4.5.3. Técnica Laboratorial

Coleta das Amostras

Amostra de Escarro

Foram coletadas amostras do primeiro escarro da manhã em recipiente estéril, de preferência em jejum, antes da escovação dos dentes. O material foi levado após coleta o mais rapidamente possível ao laboratório, onde foi colocado sob refrigeração para evitar crescimento bacteriano excessivo, prejudicando a avaliação do BAAR.

Nos pacientes que não produziram escarro espontaneamente, foi realizada a indução de escarro (IE) através de nebulização com solução salina hipertônica a 3%,

durante 20 minutos, com objetivo de obter material adequado para realização do exame. A solução salina hipertônica causa irritação brônquica, estimulando a secreção de material proveniente das vias aéreas inferiores (PARRY et al., 1995; CONDE et al., 2000)

Análise do material Coletado

Os espécimes foram descontaminados obedecendo-se às recomendações publicadas no *Manual of Clinical Microbiology 9 edição* (Apêndice B). O sedimento obtido após a descontaminação foi dividido em três alíquotas, uma para o exame microscópico, após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen, outra para cultura nos meios de Lowenstein-Jensen e 7H9 de Middlebrook (Bactec, Becton-Dickinson) e a terceira para realização da qPCR (LEMAITRE et al., 2004).

Exame Direto do Escarro

Método de exame direto: 1µl do sedimento foi colocado em uma lâmina de microscopia, seco ao ar e fixado em metanol e corado pelo método de Ziehl-Neelsen (Apêndice B) (LIMA et al., 2008).

4.5.4. Cultura para Micobactéria

Meio Löwenstein-Jensen (LJ): Após semeado o material descontaminado, os meios de cultivo foram colocado em estufa a 37°C e examinados para a presença de crescimento bacteriano duas vezes por semana nas primeiras duas semanas e uma vez por semana até completar oito semanas, para que o resultado definitivo fosse obtido. As culturas que não apresentaram crescimento após oito semanas foram descartadas como negativas (LEMAITRE et al., 2004).

Todas as culturas positivas para *Mycobacterium*, com qPCR negativa para o *M.tuberculosis*, foram submetidas ao teste de qPCR para identificação e confirmação do complexo *M.tuberculosis*, utilizando-se “primers” e sondas desenhados por Leung et al. (2009).

Meio líquido 7H9: Middlebrook e col. desenvolveram este meio para cultura de micobactérias. Este meio é composto de glicerol, ácido oléico, albumina e dextrose. A solução foi autoclavada a 121°C por 15min (Batimore Biologicals Laboratory, Becton Dickinson et al.). Dois mililitros da solução do preparado da cultura de 7H9 foram colocados em tubo estéril e refrigerado a 4-8°C até o uso, ficando em incubação a 37°C. Os resultados foram obtidos mais rapidamente, em média no máximo com 21 dias.

4.5.5. Técnica de PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR):

1ª Etapa: Extração do DNA no escarro: Foi utilizado o minikit QIAamp DNA seguindo as recomendações do fabricante para protocolo de tecido e manufaturado pelo Qiagen, Hilden, Alemanha. Em resumo: Adicionou-se-se ao microtubo 20 µl de proteinase K, 180 µl da amostra e 200 µl de Buffer AL-Vortex. Incubou-se em banho maria a 70°C por 10 minutos, centrifugou-se por 30 segundos e adicionou-se 200 µl de etanol – Vortex 15 segundos. Novamente centrifugar o material por 30 segundos e colocar no Spin column, centrifugar 8.000 rpm por 1 minuto. Troca-se o tubo, descarta-se a coluna e adiciona-se 500 µl AW1 – 8.000 rpm por 1 minuto. Faz-se nova troca de tubo, descarta-se a coluna e adiciona-se 500 µl AW2 – 14.000 rpm por 3 minutos. Coloca a coluna em tubo de 1,5 ml e elue com 200 µl de Buffer AE. Incuba-se a temperatura ambiente por 5 minutos, centrifuga-se 8.000 rpm por 1 minuto e estoca a -20°C. 05 µl do volume do DNA extraído serão usados para PCR.

2ª Etapa: Amplificação do DNA: Em resumo: Foram utilizados iniciadores e sondas para a seqüência IS6110 (Banco de Gene nº X52471), desenhados do *Primer Express Software*, versão 2.0 (BIOSYSTEMS), obtidos da Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido. As seqüências nucleotídicas dos iniciadores foram: 5'-CCGAGGCAGGCATCCA-3' (posição 1062 a 1077) e 5'-GATCGTCTCGGCTAGTGCATT-3' (posição 1112 a 1132). A seqüência da sonda foi 5'-FAM-TCGGAAGCTCCTATGAC-MGB-3' (posição 1095 a 1111).

Na PCR a amplificação foi realizada em triplicata com volume total de 25 µl contendo a TaqMan Universal PCR master mix 2X (Applied Biosystems), com 300 nM de cada primer, 200 nM de sonda e 5µl de DNA extraído. Utilizou-se o termociclador BioRad

icycler IQ 5, nas seguintes condições: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A qPCR foi analisada através do Bio-Rad iQ5 software versão 1.0. Utilizou-se para cada reação controles positivo e negativo.

4.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco e Hospital Correia Picanço em 16/06/2009. Protocolo: 01.470.172.000-09 (Anexo I).

O autor da pesquisa esclareceu aos pacientes a respeito do estudo e as etapas que constaram da pesquisa. Aqueles que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (Apêndice C).

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.7.1. Definição do tamanho da amostra

Para determinação do tamanho amostral utilizou-se como parâmetro um estudo de avaliação de acurácia da qPCR que obteve uma sensibilidade de 90% (Lemaitre et al. 2004). A partir daí definiu-se uma proporção esperada (p) de 0,10 e uma amplitude total do intervalo de confiança (w) de 0,10 com um nível de confiabilidade de 95%, obtendo-se um tamanho amostral de 138 indivíduos (utilizando a tabela específica de tamanho da amostra, (HULLEY, 2003, p. 110).

4.7.2. Métodos estatísticos

Os resultados foram expressos através de percentuais e das medidas estatísticas: média, mediana e desvio padrão. Para verificar o grau de concordância entre os dois meios de cultura (LJ e 7H9) foi utilizado o índice de Kappa e para avaliação da qPCR em relação ao padrão ouro utilizou-se medidas expressas em percentuais: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, negativo e acurácia.

Para avaliar a associação significativa entre variáveis categóricas utilizou-se o teste do Qui-quadrado de Pearson ou teste Exato de Fisher quando as condições para utilização do teste do Qui-quadrado não foram verificadas. A margem de erro foi 5% (ALTMAN, 1991).

O programa utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for Social Sciences) na versão. 17.

5. RESULTADOS

5.1. ARTIGO 1

Artigo submetido à revista *TMIH (Tropical Medicine & International Health)*.

PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para diagnóstico da tuberculose pulmonar em escarro de pacientes com HIV/aids.

Quantitative real time PCR (qPCR) for pulmonary tuberculosis' diagnosis among HIV/AIDS patients' sputum smear.

Yvana Maria Maia de Albuquerque¹, Ana Luiza Magalhães de Andrade Lima³, Ana Kelly Lins², Marcelo Magalhães², Vera Magalhães^{1,2}

1. Pós-graduação Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil. 2. Laboratório Marcelo Magalhães, Recife-PE, Brasil. 3. Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife-PE, Brasil.

Descritores (Palavras-chave): HIV/AIDS/Tuberculose-coinfecção, Diagnóstico, PCR em tempo real.

Keywords: HIV/AIDS/ tuberculosis co-infection, diagnosis, real time PCR.

Resumo

Objetivo: Avaliar a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) para diagnóstico da tuberculose pulmonar (TBP) em escarro de pacientes com aids e suspeita clínica de TBP. **Método:** Trata-se de estudo prospectivo para avaliação de acurácia de teste diagnóstico, realizado em 140 espécimes de escarro provenientes de 140 pacientes com aids e suspeita clínica de TBP atendidos em dois hospitais de referência para atendimento HIV/aids em Recife-PE. Utilizou-se a cultura em meios Löwenstein-Jensen e 7H9 como padrão ouro. **Resultados:** Dos 140 espécimes de escarro, 47 (33,6%) foram positivos pelo padrão ouro. A qPCR foi positiva em 42 (30%) dos 140 pacientes. Em apenas um(0,71%) caso não concordou com a cultura. A sensibilidade, especificidade e acurácia da qPCR foram 87,2%, 98,9% e 95% respectivamente. Das 42 qPCR positivas em 39 (93%) o CT(threshold cycle) foi igual ou inferior a 37. **Conclusão:** A qPCR realizada em amostra de escarro de pacientes com aids demonstrou sensibilidade, especificidade e acurácia satisfatória, podendo ser recomendada como método de diagnóstico de TBP.

Abstract

Objective: To assess quantitative real-time polymerase chain reaction (q-PCR) for the sputum smear diagnosis of pulmonary tuberculosis (PTB) in patients living with AIDS with a clinical suspicion of PTB. **Method:** This is a prospective study to assess the accuracy of a diagnostic test, conducted on 140 sputum specimens from 140 patients living with AIDS with a clinical suspicion of PTB, attended at two referral hospitals for people living with HIV/AIDS in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. A Löwenstein-Jensen medium culture and 7H9 broth were used as gold standard. **Results:** Of the 140 sputum samples, 47 (33.6%) were positive with the gold standard. q-PCR was positive in 42 (30%) of the 140 patients. Only one (0.71%) did not correspond to the culture. The sensitivity, specificity and accuracy of the q-PCR were 87.2%, 98.9% and 95% respectively. In 39 (93%) of the 42 q-PCR positive cases, the CT (threshold cycle) was equal to or less than 37. **Conclusion:** q-PCR performed on sputum smears from patients living with AIDS demonstrated satisfactory sensitivity, specificity and accuracy, and may therefore be recommended as a method for diagnosing PTB.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um importante fator de risco para o desenvolvimento de tuberculose (TB). O HIV aumenta tanto o risco de reativação da infecção latente como a reinfeção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (Kibiki et al. 2007). O risco anual de progressão para TB-doença entre os pacientes coinfetados varia entre cinco e 15%, dependendo do grau de imunodepressão, contra 0,5% e 1% nos não coinfetados (Melo et al. 2009).

A tuberculose pulmonar (TBP) em pacientes com HIV/aids, na maioria dos casos, apresenta forma clínica atípica e frequentemente é indistinguível do ponto de vista clínico e radiológico de outras infecções oportunistas (Kibiki et al. 2007).

As técnicas laboratoriais convencionais utilizadas para o diagnóstico da TBP, como o exame de escarro após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen, apesar do baixo custo, apresenta baixa sensibilidade, pois, a maioria dos pacientes coinfetados são paucibacilares (Van Cleeff et al. 2004; Kivihya-Ndugga et al. 2004; Scherer et al. 2011). A cultura apesar de ter maior sensibilidade, entre 19 e 96% e especificidade de 100%, sendo o método padrão ouro, requer de quatro a oito semanas para a obtenção do resultado (Rewata et al. 2009; Padmapriyadarsini et al. 2011; Scherer et al. 2011).

Na prática diária, é comum a administração dos medicamentos antiTB nos pacientes com aids, sem uma confirmação da infecção, devido à dificuldade diagnóstica e gravidade das manifestações clínicas. Esta conduta leva frequentemente ao surgimento de complicações, não apenas pela toxicidade apresentada pelas drogas antituberculose, como também, pela interação entre estes medicamentos e a terapia antirretroviral (TARV) (El-Sadr et al. 2008).

Estudos sugerem a inclusão da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) como método que poderia auxiliar no diagnóstico de uma variedade de infecções, inclusive a causada pelo MTB (Lemaitre et al. 2004; Ortu et al. 2006; Espy et al. 2006; Kim et al. 2010). A qPCR dispensa a etapa de eletroforese em gel para avaliação dos resultados. Desse modo, é uma técnica mais rápida e mais sensível, além do menor risco de causar contaminação do ambiente (Giulietti et al. 2001; Kim et al. 2010).

O objetivo da presente pesquisa é avaliar a qPCR para diagnóstico de TBP em escarro de pacientes com aids e suspeita clínica de TBP.

METODOLOGIA

Estudo prospectivo, para avaliação de acurácia de teste diagnóstico, realizado entre agosto de 2009 e janeiro de 2012. Foram incluídos pacientes com idade acima de 18 anos, infectados pelo HIV e com suspeita clínica de TBP, atendidos em dois hospitais de referência para atendimento HIV/aids em Recife-PE. Excluiu-se os pacientes em tratamento com drogas antiTB ou que não tinham condições de fornecer amostra de escarro para o estudo.

Todos os pacientes apresentavam sorologia positiva para o HIV, realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA; Abott Laboratories) e confirmada pela imunofluorescência ou western-blot, como exigido pelo Ministério da Saúde (Portaria nº59).

Coletou-se uma amostra de escarro de cada paciente. Nos doentes que não produziram escarro espontaneamente foi realizada a indução de escarro através de nebulização com solução salina hipertônica a 3%, durante 20 minutos, com objetivo de obter material adequado para realização dos exames (Parry et al. 1995; Conde et al. 2000). Os dados coletados foram armazenados em banco de dados da pesquisa.

As amostras de escarro foram descontaminadas método N-acetil cisteína hidróxido de sódio. Do sedimento obtido preparou-se lâmina para exame direto, realizado após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen, e semeadura no meio sólido de Löwenstein-Jensen (LJ (Difco-USA)) e no meio líquido 7H9 (Becton-Dickinson Co. MD-USA). O restante do sedimento foi mantido à -80°C até a realização da qPCR para a evidenciação de DNA do complexo MTB.

O material cultivado foi examinado duas vezes por semana nas primeiras duas semanas e uma vez por semana até completar oito semanas. A cultura, padrão ouro, foi considerada positiva quando pelo menos um dos meios de cultura apresentou crescimento micobacteriano. Além disso, para se confirmar a identidade da espécie *M. tuberculosis* dentro do complexo MTB realizou-se o teste comercial da acumulação niacina (Becton, Dickinson).

A metodologia da qPCR utilizada foi previamente publicada por Lemaitre et al. (2004) e envolveu:

1ª Etapa: Extração do DNA do escarro: utilizou-se o QIAamp DNA mini kit, protocolo de tecido, seguindo-se às recomendações do fabricante e manufaturado pelo Qiagen, Hilden, Alemanha.

2ª Etapa: Amplificação do DNA: Em resumo: Foram utilizados iniciadores e sondas para a seqüência IS6110 (Banco de Gene nº X52471), desenhados do *Primer Express Software*, versão 2.0 (BIOSYSTEMS), obtidos da Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido. As seqüências nucleotídicas dos iniciadores foram: 5'- CCGAGGCAGGCATCCA-3' (posição 1062 a 1077) e 5'- GATCGTCTCGGCTAGTGCATT-3' (posição 1112 a 1132). A seqüência da sonda foi 5'-FAM-TCGGAAGCTCCTATGAC-MGB-3' (posição 1095 a 1111).

Na PCR a amplificação foi realizada em triplicata com volume total de 25 µl contendo a TaqMan Universal PCR master mix 2X (Applied Biosystems), com 300 nM de cada primer, 200 nM de sonda e 5µl de DNA extraído. Utilizou-se o termociclador BioRad icycler IQ 5, nas seguintes condições: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A qPCR foi analisada através do Bio-Rad iQ5 software versão 1.0. Utilizou-se para cada reação controles positivo e negativo.

Todos os isolados de cultura positivos para micobactéria e negativos para qPCR para o MTB foram submetidos ao teste de qPCR para identificação dos complexos MTB, *M.avium-intracellulare*, *M.chelonae/abscessus* e *M.kansasii*, utilizando-se iniciadores e sondas desenhados por Leung et al. 2009.

Os pacientes foram avaliados no momento da coleta do material, reavaliados após resultado da cultura, observando-se a resposta ao tratamento antiTB.

Para análise dos dados foram obtidos sensibilidade, especificidade valor preditivo positivo, negativo e acurácia. Utilizou-se o índice de Kappa para comparação dos meios LJ e 7H9. O teste do quiquadrado de Pearson foi utilizado para avaliar associação entre variáveis categóricas; a margem de erro foi de 5%. O programa utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos foi o SPSS na versão 17.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), protocolo nº 01.470.172.000-09.

RESULTADOS

Analísaram-se 140 espécimes de escarro provenientes de 140 pacientes com HIV/aids e suspeita clínica de TBP. Destes 47(33,6%) confirmados através da cultura, 78 (55,7%) eram do sexo masculino. A idade variou entre 19 e 64 anos, média de 37,13 anos, mediana de 36 anos e desvio padrão de 9,86 anos.

No que concerne às culturas, 42 (30%) foram positivas nos meios sólidos e líquido, três (2,14%) positivas apenas no LJ e duas (1,4%) positivas apenas no 7H9. Houve uma (0,7%) contaminação no LJ e duas (1,4%) no 7H9. O índice de Kappa foi 0,89. (Tabela 1).

Para avaliar a sensibilidade da cultura dois especialistas em doenças infecciosas, com mais de 20 anos de experiência, analisaram, separadamente, os dados clínicos dos prontuários dos pacientes com culturas negativas em que foi iniciado o tratamento antituberculose. Foram identificados dez casos possíveis de TBP pelos achados clínicos e resposta terapêutica, com cultura negativa, apenas em um a qPCR foi positiva. Como dois dos dez doentes foram a óbito, não sendo possível avaliar a resposta ao tratamento, restaram apenas oito com TBP e cultura negativa, sendo a sensibilidade da cultura de 85,4%.

Em 37 (26,4%) dos 140 pacientes o exame direto do escarro após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen foi positivo. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia do exame direto foi 78,7%, 100%, 100%, 90,3% e 92,8%, respectivamente (Tabela 2).

A qPCR foi positiva em 42 (30%) dos 140 suspeitos de TBP. Em apenas um (0,71%) não concordou com o padrão ouro. A sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia da qPCR foram respectivamente: 87,2%, 98,9%, 97,6%, 93,9% e 95% (Tabela 2).

Dos 42 pacientes com qPCR positiva para MTB, em 39 (93%) o CT (*threshold cycle*) foi igual ou inferior a 37. A sensibilidade da qPCR, considerando-se esse valor CT como indicativo de positividade, foi 92,3%, o VPP 97,5% e a acurácia 92,9%. Não foi possível determinar a especificidade e VPN devido à baixa frequência (um caso) de resultado negativo, quando comparado à cultura, método padrão ouro (Tabela 2).

A contagem das células T CD₄ variou entre dois e 1301 cel/mm³ apresentando uma mediana de 148,50. Não se observou diferença estatisticamente

significante entre o resultado da qPCR e o valor das células CD₄, p=0,952 (teste Quiquadrado de Pearson).

Tabela 1 – Comparação entre dois meios de cultura utilizados para diagnóstico de TBP em escarro de pacientes coinfectados com HIV.

LJ	7H9		Negativo		Contaminados		TOTAL		Kappa (IC 95%)
	Positivo		N	%	n	%	n	%	
	N	%							
Positivo	42	30,0	3	2,1	-	-	45	32,1	0,89 (0,81 a 0,97)
Negativo	1	0,7	91	65,0	2	1,4	94	67,1	
Contaminado	1	0,7	-	-	-	-	1	0,7	
TOTAL	44	31,4	94	67,1	2	1,4	140	100,0	

Tabela 2 – Comparação entre a qPCR e exame direto com os resultados da cultura (Padrão ouro): sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (A)

Teste	Padrão ouro		Total	Medidas percentuais				
	Positiva	Negativa		S	E	VPP	VPN	A
• PCR-1								
Positivo	41	1	42	87,2	98,9	97,6	93,9	95,0
Negativo	6	92	98					
Total	47	93	140					
• PCR-2								
CT Até 37	39	1	40	92,3		97,5		92,9
CT > 37	2	-	2					
Total⁽¹⁾	41	1	42					
• BAAR								
Positivo	37	-	37	78,7	100,0	100,0	90,3	92,8
Negativo	10	93	103					
Total	47	93	140					

(1): A qPCR somente foi positiva para 42 pacientes.

DISCUSSÃO

Dos 140 pacientes estudados com suspeita clínica de TBP em apenas 47 (33,6%) confirmou-se a TBP pela cultura, o método considerado padrão ouro. Entretanto, o tratamento antiTB foi iniciado em 75 (53,6%) dos pacientes suspeitos sendo que em 28 (20%) esse tratamento foi iniciado sem confirmação diagnóstica. Em apenas oito (5,7%) desses pacientes observou-se resposta terapêutica ao tratamento antiTB, segundo os dois especialistas que reviram os prontuários que os considerou casos de TBP com cultura negativa. É frequente o tratamento empírico para TB, nos pacientes com aids e sintomas respiratórios, pela elevada frequência e gravidade dessa coinfeção, além da dificuldade na agilidade do diagnóstico através da cultura. Entretanto, essa conduta nem sempre é benéfica, pois os pacientes coinfectados apresentam mais efeitos adversos com as drogas antiTB (De Lima & Melo, 2012). Além disso, pode haver interação entre os fármacos antiTB e a TARV, o que pode limitar a resposta terapêutica nesses pacientes. Esses fatos reforçam a importância de um teste diagnóstico rápido e seguro, para que haja a redução desses tratamentos desnecessários.

Utilizou-se como padrão ouro a cultura, realizada nos meios sólido e líquido, obtendo-se alto índice de concordância entre ambos, 42 das 47 culturas positivas. As contaminações não interferiram nos resultados. Os dois espécimes contaminados no 7H9 foram negativos no LJ e os pacientes tiveram o diagnóstico de pneumonia bacteriana, com boa resposta clínica à antibioticoterapia. O único caso em que houve contaminação do meio LJ, posteriormente confirmou-se TBP, através do meio 7H9, com resposta favorável ao tratamento antiTB. A utilização dos dois meios de cultura abrevia o tempo de resultado da cultura, desde que o 7H9 fornece resultados mais rápidos, e auxilia na avaliação das contaminações.

A sensibilidade e especificidade do exame direto foi 78,7% e 100% respectivamente, sendo a sensibilidade superior e a especificidade semelhante a de outros estudos. Kibiki et al. (2007) encontraram no exame direto sensibilidade de 66%, enquanto Rewata et al. (2009), 66,7% e Scherer et al. 2011, 60%. O VPP e o VPN do exame direto foram respectivamente, 100% e 90,3%. O VPP foi semelhante e o VPN superior ao encontrado por Rewata et al., (2009), que obtiveram um VPN de 83,3%. A elevada sensibilidade do exame direto encontrada, provavelmente está relacionada ao método de obtenção da amostra de escarro no nosso estudo. Em 26

(18,6%) dos pacientes com queixa de tosse seca, utilizou-se a técnica de indução do escarro. A indução do escarro promove uma coleta de melhor qualidade, semelhante à obtida pelo lavado broncoalveolar (LBA) obtido pela broncoscopia (Parry et al. 1995; Conde et al. 2000). Além disso, o exame direto foi realizado após descontaminação do escarro e posterior centrifugação, que podem também ter contribuído para uma maior sensibilidade do exame.

A qPCR demonstrou sensibilidade e especificidade de 87,2% e 98,9%, respectivamente. Estes achados foram semelhantes aos de Kibiki et al. (2007) que realizaram a qPCR no LBA de pacientes com HIV/aids. Nesta pesquisa os resultados foram sensibilidades de 85,7% e 96,4% e especificidades de 52,3% e 90,9% com CTs de 32 e 40. É importante chamar a atenção que no presente estudo utilizou-se escarro na avaliação da qPCR, enquanto Kibiki et al. (2007), o LBA. A obtenção de resultados semelhantes, sugere que a indução de escarro através da nebulização se equivale ao LBA, demonstrando a utilidade desse procedimento em regiões onde há dificuldade de realização da broncoscopia.

Das 42 qPCR positivas, apenas uma não foi confirmada pela cultura, este paciente forneceu uma quantidade relativamente elevada de DNA do MTB (Ct = 35) e satisfatória resposta ao tratamento antituberculose, sugerindo uma falha da cultura. Na realidade, a sensibilidade da cultura, apesar de ser o método padrão ouro, pode não ser tão elevada nos pacientes paucibacilares. A sensibilidade da cultura em pacientes coinfectados varia entre 19 e 96% (Rewata et al. 2009).

O nível populacional das células T CD4 não pôde ser relacionado com o resultado da qPCR. Isso demonstra a utilidade desse exame para o diagnóstico da TBP em todas as fases da infecção pelo HIV. Nos pacientes com aids avançada, com baixa contagem de CD₄, a TBP se apresenta de forma atípica, podendo ser confundida com diversas outras infecções (Melo et al. 2009). O diagnóstico precoce e efetivo da TBP é imprescindível para o adequado tratamento do paciente, além de reduzir a transmissibilidade do MTB (Boehme et al. 2010).

Conclui-se que a qPCR, realizada em amostras de escarro obtidas espontaneamente ou após indução, apresenta sensibilidade, especificidade e acurácia satisfatórias. Assim a técnica, dada a sua maior rapidez, é recomendável para utilização rotineira no manuseio de pacientes portadores de HIV/aids.

Agradecimentos: os autores agradecem ao Laboratório Marcelo Magalhães pelo suporte na realização dos exames de escarro.

Referências bibliográficas

Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D et al. (2010) D. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *New England Journal of Medicine* **363**, 105-1015.

Conde MB, Soares SLM, Mello FCQ et al. (2000) Comparison of Sputum Induction with Fiberoptic Bronchoscopy in the Diagnosis of Tuberculosis: Experience at an Acquired Immune Deficiency Syndrome Reference Center in Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*. **162**, 2238-2240.

De Lima MdFS & de Melo HRL (2012) Hepatotoxicity induced by antituberculosis drugs among patients coinfect with HIV and tuberculosis. *Reports in Public Health* **28**, 698-708

El-Sadr WM & Tsiouris SJ (2008) HIV-Associated Tuberculosis: Diagnostic and Treatment Challenges. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **29**, 525-531.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM et al. (2006) Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 165-256.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R & Mathieu C (2001) An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* **25**, 386-401.

Kibiki GS, Mulder B, Ven AJAM et al.(2007) Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M.tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid. *Tropical Medicine and International Health* **12**, 1210-1217.

Kim K, Lee H, Lee M et al. (2010) Development and Application of Multiprobe Real-Time PCR Method Targeting the hsp65 Gene for Differentiation of Mycobacterium

Species from Isolates and Sputum Speimens. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 3073-3080.

Kivihya-Ndugga L, Van Cleeff M, Juma E et al.(2004) Comparison of PCR with the Routine Procedure for Diagnosis of Tuberculosis in Population with High Prevalences of Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1012-1015.

Lemaitre N, Armand S, Vachée A, Capilliez O, Dumoulin C & Courcol RJ (2004) Comparison of the Real Time PCR Method and the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary and Nonpulmonary Specimens. *Journal of Clinical. Microbiology* **42**, 4307-4309.

Leung KI, Yip CW, Cheung WF, Lo ACT, Ko WM, Kam KM (2009) Development of a simple and a low-cost real-time PCR method for the identification of commonly encountered mycobacteria in a high throughput laboratory. *Journal of Applied Microbiology* **107**, 1364-77.

Melo FA F, Afiune JB, Hijja MA et al. (2009) Tuberculosis and HIV/AIDS coinfections. In: *Treaty of Infectology*. 4th edn (eds. R Veronesi, R Focaccia) Atheneu, São Paulo, pp. .1313-1321.

Ortu S, Moliccotti P, Sechi LA. et al. (2006) Rapid detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by Real Time PCR and Bactec 960 MIGT. *The New Microbiology* **29**, 75-80.

Padmapriyadarsini C, Narendran G & Swaminathan (2011) Diagnosis and treatment of tuberculosis in HIV co-infected patients. *Indian Journal of Medical Resarch* **134**, 850-865.

Parry CM, Kamoto O, Harries AD et al. (1995) The use of sputum induction for establishing a diagnosis in patients with suspected pulmonary tuberculosis in Malawi. *Tubercle. and Lung Disease* **76**, 72-76.

Rewata L, Rutherford M, Apriani L et al. (2009) Improving Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis Among HIV/AIDS Patients: Literature Review and Experience in Teaching Hospital in Indonesia. *ACTA Med Indonesiana Journal Internal Med.* **41**, 57-64.

Scherer LC, Sperhackle RD, Jaraziwski C et al. (2011) Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection. *BMC Pulmonary Medicine* **11**. <http://www.biomedcentral.com/1471-2466/11/15>.

Van Cleeff M, Kivihya-Ndugga L, Githnui et al. (2005) Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **9**, 877-883.

5.2. ARTIGO 2

Artigo submetido à Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Alterações radiográficas do tórax de pacientes com HIV/aids e tuberculose pulmonar.

Chest radiographic findings in patients with HIV/AIDS and pulmonary tuberculosis.

Yvana Maria Maia de Albuquerque

Doutoranda em Medicina Tropical-UFPE
Médica Infectologista Hospital Correia Picanço – Secretaria de Saúde - PE

Ana Luiza Magalhães de Andrade Lima

Aluna do sexto ano médico da Faculdade Pernambucana de Saúde/FPS
Bolsista de Iniciação Científica

Ana Carolina Brandão e Silva

Especialista em Radiologia pelo Colégio Brasileiro de Radiologia-CBR
Médica Radiologista Hospital Correia Picanço – Secretaria de Saúde – PE

Eolo Santana de Albuquerque Filho

Médico Radiologista do Hospital das Clínicas da UFPE

Ana Rodrigues Falbo

Doutora em Saúde Pública- Escola de Saúde Pública/FIOCRUZ
Pesquisadora da Faculdade Pernambucana de Saúde-FPS

Vera Magalhães

Doutorado em Doenças Infecciosas UNIFESP
Profª Titular Doenças Infecciosas-UFPE
Profª Pós-graduação Medicina Tropical-UFPE

Trabalho realizado no Hospital das Clínicas-UFPE e Hospital Correia Picanço, Recife-PE.

Endereço para correspondência: Yvana Maria Maia de Albuquerque. Rua João Cardoso Aires, 267 / 202, Boa Viagem, CEP:51130-300, Recife, PE, Brasil. E-mail: yvana.albuquerque@terra.com

RESUMO

Objetivo: Descrever as principais alterações radiográficas do tórax de pacientes com HIV/aids e tuberculose pulmonar, confirmada através da cultura de escarro. **Método:** Trata-se de estudo descritivo, prospectivo. Foram realizados um total de 140 exames de escarro provenientes de pacientes com HIV/aids com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, desses, 42 pacientes preencheram os critérios estabelecidos pelo estudo e compuseram a amostra. Os pacientes foram atendidos em dois hospitais de referência para HIV/aids no Recife-PE, no período de agosto de 2009 a janeiro de 2012. **Resultados:** A alteração radiológica isolada mais freqüente foi a consolidação parenquimatosa com seis (14,3%) dos pacientes, seguida pelo infiltrado intersticial, micronodular difuso (miliar) e a associação infiltrado com consolidação parenquimatosa, acometendo cinco (11,9%) dos pacientes cada. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os achados radiológicos e a contagem das células T CD₄, p=0,680. **Conclusão:** Os achados radiográficos do tórax foram inespecíficos, não sendo o RX de tórax suficiente como método isolado para sugerir diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com HIV/aids.

ABSTRACT

Objective: To describe the major chest radiographic alterations among people living with HIV/AIDS and pulmonary tuberculosis, confirmed by sputum culture. **Method:** This was a descriptive, prospective study involving a total of 140 sputum tests from 140 people living with HIV/AIDS and a clinical suspicion of pulmonary tuberculosis. From amongst this number, 42 met the established criteria and were therefore included in the study. All patients were attended at two reference hospitals in Recife-Pernambuco, Brazil, between August 2009 and January 2012. **Results:** The most common radiological alteration was parenchymal consolidation, encountered in six (14.3%) patients, followed by interstitial infiltrate, diffuse micronodular (miliary) pattern and an association between interstitial infiltrate and parenchymal consolidation, each being encountered in five (11.9%) patients. No statistically significant difference was observed between the radiological findings and the CD₄T cell count, $p=0.680$. **Conclusion:** Chest radiographic findings were not specific, therefore indicating that chest radiography is not sufficient in itself to establish a diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients living with HIV/AIDS.

Introdução

A tuberculose constitui sério problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, com 9,4 milhões de casos novos, destes, 1,1 milhão em coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (1).

A infecção pelo HIV é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da tuberculose (TB). O risco da infecção pelo *M.tuberculosis* evoluir para doença é de 10% ao longo de toda a vida em pessoas imunocompetentes, enquanto em pacientes soropositivos para o HIV esse percentual passa a ser de oito a 10% a cada ano (2). A tuberculose pulmonar (TBP) pode ocorrer em qualquer fase da infecção pelo HIV e os pacientes coinfectados devem realizar terapia antirretroviral (TARV) (3).

O diagnóstico da TBP nos pacientes com aids é difícil, a cultura de escarro, método padrão ouro, apresenta resultados tardios de quatro a oito semanas. A maioria dos pacientes são paucibacilares, apresentando frequentemente, exame direto negativo (4). A radiografia de tórax constitui o método-escolha de imagem inicial e no acompanhamento da TBP, fazendo parte da rotina médica nesse grupo de doentes (5). Entretanto, em revisão da literatura, observou-se poucos estudos realizados no Brasil, que avaliassem achados radiográficos de tórax com confirmação laboratorial de TBP (2,10). É importante enfatizar que nos pacientes com aids, o pulmão é um órgão comumente acometido por processos infecciosos (virais, bacterianos, fúngicos) e neoplasias, sendo as alterações pulmonares

geralmente inespecíficas (6). Esse fato torna o diagnóstico clínico-radiológico da TBP em coinfectados mais difícil.

Em estudo retrospectivo realizado no sul do Brasil, com objetivo de avaliar as alterações radiográficas de tórax em pacientes coinfectados HIV/*M.tuberculosis*, evidenciou-se o infiltrado intersticial como a alteração prevalente, seguida pelo padrão de consolidação (2).

O objetivo do presente estudo é descrever as principais alterações radiográficas do tórax de pacientes com HIV/aids e TBP, confirmada através de cultura de escarro, em pacientes atendidos em hospitais de referência para HIV/aids no Recife.

Método

Estudo descritivo, prospectivo, realizado em pacientes infectados pelo HIV que apresentavam também TBP, atendidos em dois hospitais de referência para atendimento de pacientes HIV/aids no Recife, no período compreendido entre agosto de 2009 e janeiro de 2012.

Foram incluídos no estudo os indivíduos que apresentavam sorologia positiva para o HIV, realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), com antígeno obtido pela técnica do DNA recombinante (Abott Laboratories, Chicago II), que tiveram a infecção confirmada pela imunofluorescência ou western-blot e suspeita clínica de TBP. Todos os pacientes apresentavam idade igual ou superior a 18 anos e poderiam estar ou não em uso TARV. Foram excluídos do estudo os pacientes em tratamento com drogas antituberculose, doenças pulmonares crônicas e aqueles sem condições clínicas de fornecerem a amostra de escarro necessária ao estudo.

Nos pacientes que não produziram escarro espontaneamente, foi realizada a indução de escarro através de nebulização com solução salina hipertônica a 3%, durante 20 minutos, com objetivo de obter material adequado para realização dos exames. Coletou-se uma amostra de escarro de cada paciente.

O diagnóstico de TBP foi realizado através da cultura de escarro, semeadas pelos meios Löwenstein-Jensen (LJ) e meio líquido 7H9 (Bactec) para identificação da micobactéria.

Todos os exames de cultura positivos para micobactéria foram submetidos ao teste de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) para

identificação e confirmação do complexo *M.tuberculosis*, utilizando-se “primers” e sondas desenhados por Leung et al, (7).

As radiografias de tórax foram realizadas antes do início do tratamento antituberculose, utilizando-se as incidências pósterio-anterior e perfil. Os exames radiográficos foram analisados de forma independente por dois radiologistas, com experiência de mais de 20 anos em radiografia torácica, que forneceram os laudos sem terem conhecimento da situação clínica e resultado dos exames laboratoriais dos pacientes. Nos casos discordantes o resultado foi definido por consenso entre os dois especialistas.

Os dados pessoais, características epidemiológicas, clínica e exames realizados, foram coletados por meio de formulário específico da pesquisa, sendo as informações obtidas por entrevista com os pacientes e/ou através de revisão de prontuários.

As radiografias de tórax foram definidas em normais e anormais. Os exames anormais foram classificados de acordo com a presença de alterações em infiltrado intersticial, consolidação parenquimatosa, adenopatia hilar e/ou mediastinal, cavidade, infiltrado micronodular difuso (miliar) e derrame pleural, além da associação de duas ou mais destas alterações (8).

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas, percentuais uni e bivariadas e as medidas estatísticas: média, mediana e desvio padrão (técnicas de estatística descritiva) e o teste Exato de Fisher (técnica de estatística inferencial), a margem de erro foi de 5%. O teste de Kappa foi realizado para avaliar a concordância entre os resultados dos dois radiologistas (9). O programa estatístico utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), na versão 17.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (Protocolo Nº 01.470.172.000-09).

Resultados

De um total de 140 exames de escarro, provenientes de 140 pacientes com HIV/aids e suspeita de TBP. Em 47 amostras foi comprovada a TBP através da cultura. Cinco (10,6%) dos doentes foram excluídos do estudo por não terem realizado radiografia (RX) do tórax. Sendo a amostra constituída de 42 doentes.

A TBP isoladamente foi diagnosticada na maioria (78,6%) dos pacientes, enquanto à forma extrapulmonar ocorreu em nove (21,4%) dos doentes, sendo cinco (11,9%) ganglionar e em quatro (9,5%) disseminada.

Dos 42 pacientes estudados 22(52,4%) eram do sexo masculino. A idade dos participantes variou entre 20 e 53 anos, com média de 33,6 anos.

A tosse produtiva acometeu 34 (81%) dos participantes do estudo. A queixa de febre sem padrão definido foi referida por 23(54,8%) dos doentes, enquanto febre vespertina foi relatada por 19(45,2%), seguida pela perda ponderal referida por 32(76,2%) (TABELA 1).

A contagem de células T CD₄ foi realizada em 36 dos 42 pacientes e variou entre dois e 1.170cel/mm³ de sangue, com média de 216,44, mediana de 140,5 e desvio padrão de 224,60. Em 25 (59,5%) dos pacientes a contagem de células T CD₄ foi menor que 200cel/mm³. O paciente com CD₄ de dois o RX de tórax apresentava infiltrado intersticial difuso com áreas de consolidação e o paciente com CD₄ de 1.170cel/mm³ consolidação em um terço superior do hemitórax direito. Todos os pacientes com infiltrado micronodular difuso (miliar) tinham CD₄ menor que 200cel/mm³ (variando entre 22 e 157cel/mm³). Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a contagem das células T CD₄ e as alterações radiográficas estudadas, p=0,680 (teste Exato de Fisher).

O índice de concordância na avaliação dos achados radiográficos do tórax descritos pelos dois radiologistas foi considerado ótimo, com Kappa de 0,87.

A alteração radiológica isolada mais freqüente foi a consolidação parenquimatosa, acometendo seis (14,3%) dos pacientes, seguida do infiltrado intersticial e micronodular difuso (miliar) acometendo cinco (11,9%) dos doentes cada (TABELA 2). A cavidade foi observada em sete (16,7%) dos pacientes, sendo que em três (7,1%) como alteração isolada, nos outros três associada à consolidação e no outro doente associou-se a cavidade o infiltrado e a consolidação. A adenopatia hilar foi observada em apenas dois pacientes, associada a outras

alterações, o CD₄ destes doentes foi 26cel/mm³ e 143 cel/mm³. O derrame pleural foi observado em nove (21,4%) dos doentes, em apenas dois (4,8%) como a única alteração encontrada.

TABELA 1 – Principais manifestações clínicas apresentadas por 42 pacientes coinfectados com HIV/TB.

Manifestações Clínicas	n	%⁽¹⁾
• Febre	42	100,0
Sem padrão definido	23	54,8
Vespertina	19	45,2
• Tosse	42	100,0
Seca	8	19,0
Produtiva	34	81,0
• Perda ponderal	32	76,2
• Astenia	30	71,4
• Anorexia	29	69,0
• Mal estar geral	25	59,5
• Dispneia	16	38,1
• Sudorese noturna	11	26,2
• Hemoptóicos	5	11,9
• Dor torácica	4	9,5

(1): Os percentuais foram obtidos do número total de 42 pacientes analisados.

TABELA 2 – Achados radiográficos em 42 pacientes coinfectados HIV/TB

Alterações encontradas no resultado do RX do tórax	n	%
TOTAL	42	100,0
Consolidação parenquimatosa	6	14,3
Infiltrado intersticial	5	11,9
Micronodular difuso (miliar)	5	11,9
Consolidação + Infiltrado	5	11,9
Consolidação + Derrame Pleural	4	9,5
Consolidação + Cavidade	3	7,1
Cavidade	3	7,1
Derrame Pleural	2	4,8
Infiltrado + Derrame Pleural	2	4,8
Infiltrado + Consolidação + Derrame pleural	1	2,4
Infiltrado + Adenopatia hilar	1	2,4
Infiltrado + Consolidação + Cavidade	1	2,4
Infiltrado + Consolidação _ Adenopatia hilar	1	2,4
Consolidação + Adenopatia hilar	1	2,4
RX normal	2	4,8

Discussão

Na presente pesquisa, observou-se uma media de idade de 33,6 anos, semelhante a de outros estudos brasileiros e norte americanos (2,10,11). Esses achados reforçam os argumentos de que a coinfeção HIV/TB acomete populações mais jovens, tanto em países em desenvolvimento, quanto nos desenvolvidos (2,10,12).

Com relação ao sexo, não houve diferença significativa, fato este já observado em outros estudos realizados no Brasil (10), sendo uma consequência provavelmente, do acometimento indistinto de ambos os sexos na infecção pelo HIV, diferentemente do que ocorreu no início da epidemia.

Assim como em outros estudos (5,6,10,12), tosse e febre foram as manifestações mais encontradas nos pacientes coinfectados. Tosse produtiva foi referida por 81% dos pacientes. A caracterização da tosse ganha particular importância na prática médica na diferenciação entre a pneumocistose e a TBP, duas afecções comuns em pacientes com HIV/aids. No caso da pneumocistose, a tosse seca e a dispnéia são preponderantes, enquanto que, na TBP observa-se a tosse produtiva, habitualmente, há mais de duas semanas e ausência de dispnéia. Esta última pode estar presente, no entanto, na fase mais avançada da TBP, conforme constatado em 38,1% dos doentes. Quanto a febre, a maior parte dos

pacientes (54,8%) não apresentou um padrão definido, apesar da febre vespertina ser apontada como característica da TBP, sendo a mais comumente encontrada em pacientes com TBP não coinfetados (13).

O achado clínico de maior frequência foi a perda ponderal (76,2%), que pode ser explicada pela aids e não necessariamente, relaciona-se a TBP. A sudorese noturna e escarros hemoptóicos frequentemente referidos por pacientes não coinfetados pelo HIV com TBP, ocorreu em apenas 26,2% e 11,9% respectivamente. Esses achados indicam que as manifestações clínicas da TBP diferem em pacientes infectados e não infectados pelo HIV, dificultando assim, o diagnóstico clínico da doença em coinfetados. Na realidade, dos 140 pacientes infectados pelo HIV/aids com suspeita clínica de TBP, apenas 47 (33,6%) tiveram a infecção confirmada.

É importante ressaltar, que apesar de termos utilizado uma única amostra de escarro, nos casos onde não havia secreção suficiente, realizou-se a indução do escarro, que aumenta a sensibilidade do exame, sendo semelhante ao lavado brônquico (17,18). Pelo fato da TBP ser uma das infecções respiratórias mais frequentemente observadas em pacientes infectados pelo HIV nos países onde a TB é endêmica, como o Brasil, é comum o início empírico do tratamento antituberculose nesses pacientes. Essa medida nem sempre é benéfica, pois leva a um tratamento prolongado, com reações adversas e interação das drogas antituberculose com os antirretrovirais (16). Desse modo, torna-se importante o diagnóstico de certeza da TBP para justificar esses riscos.

A mediana dos linfócitos T CD₄ foi 140,5 cel/mm³, em 59,5% dos pacientes o CD₄ foi menor que 200 cel/mm³, entretanto não se observou diferença estatisticamente significativa entre a contagem das células T CD₄ e as alterações radiográficas encontradas. Esse resultado difere de outro estudo brasileiro em que se observou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos achados de adenopatia hilar e mediastinal nos pacientes com baixa contagem de CD₄(2).

Quanto aos achados radiológicos de tórax, o comprometimento isolado mais descrito foi à consolidação parenquimatosa, seguida pelo infiltrado intersticial, micronodular difuso (miliar) e a associação consolidação e infiltrado foram a segunda alteração radiológica mais descrita, com 11,9% em cada.. Com exceção do infiltrado micronodular difuso, sugestivo de TB miliar, os outros padrões radiográficos

não são considerados característicos de TBP, podendo ser encontrados em pneumonias bacterianas, virais e em infecções fúngicas.

Em duas (4,8%) radiografias torácicas de pacientes coinfectados com TBP, não se observou alterações. Esses achados são compatíveis com os menores percentuais descritos na literatura, que prevê exames radiológicos de tórax normais em 5 a 10% dos pacientes HIV positivos, podendo atingir até 20% quando a imunodeficiência é acentuada (10).

A cavidade, alteração radiográfica clássica de TBP, é observada geralmente em pacientes soropositivos para HIV com CD₄ normal. No presente estudo foi observada em sete (16,7%) dos 42 pacientes, nestes doentes a contagem das células T CD₄, variou entre 90 e 672cel/mm³, média de 335cel/mm³. Em quatro dos sete pacientes que apresentaram cavidade, outras alterações estavam associadas. Nos três doentes em que a cavidade foi observada como alteração radiográfica única a contagem das células T CD₄ foi acima de 350cel/mm³. Para a formação da cavidade é necessária certa integridade da imunidade celular, justificando em parte, a sua ocorrência em pacientes com CD₄ acima de 200cel/mm³.

O derrame pleural foi observado em 21,4% dos pacientes, sendo que em um quarto destes foi o único achado radiológico encontrado. O CD₄ destes pacientes variou entre sete e 672cel/mm³. Em outro estudo realizado no Brasil, observou-se que a maioria dos casos de derrame pleural ocorreu em pacientes com CD₄ inferior a 200cel/mm³ (10). Tais resultados divergem da literatura, em que o derrame pleural é citado como mais freqüente em pacientes com CD₄ acima de 200cel/mm³, refletindo uma reação pleural mais intensa (10).

É importante ressaltar que apesar da pequena amostra, realizamos um estudo prospectivo, com exames radiográficos avaliados por dois radiologistas experientes e com comprovação microbiológica da TBP. A maioria dos estudos foram retrospectivos, com laudos recuperados dos prontuários e alguns, não realizaram a cultura de escarro para o diagnóstico da TBP. Devido a existência de múltiplas infecções observadas nos pacientes com aids, muitas delas com envolvimento pulmonar, torna difícil o diagnóstico da TBP baseando-se apenas nas manifestações clínicas e radiográficas nesses pacientes.

Conclui-se que a radiografia de tórax é de pouco auxílio no diagnóstico da TBP em pacientes infectados pelo HIV/aids, pois os achados são pouco específicos,

exceto quando se encontram o padrão de cavidade e micronodular difuso, que são sugestivos da infecção.

Agradecimentos: os autores agradecem ao Laboratório Marcelo Magalhães pelo suporte na realização dos exames de escarro.

Referências

1. World Health Organization. Global tuberculosis control 2010, disponível em: <http://www.int/tb/publications/global-report/2010/en/index.html>, acesso em 21/04/2011.
2. Silva RM, Rosa L, Lemos RN. Alterações radiográficas em pacientes com a co-infecção vírus da imunodeficiência humana/tuberculose: relação com a contagem de células TCD4. J.Bras.Pneumol. 2006;32(3): 228-33.
3. Bakari M, Arbeit RD, Mtei L, Lyimo J, Waddell R, Matee M., et al. Basis for treatment of tuberculosis among HIV-infected patients in Tanzania: the role of chest x-ray and sputum culture. BMC Infect. Dis. 2008 Mar;8(32). Disponível em: [http://www.biomedcentral.com/\(47/-2334/8/32](http://www.biomedcentral.com/(47/-2334/8/32).
4. Schijman Losso MH, Montoto M, Saez CB, Smayevsky, J, Benetucci JA. Prospective evaluation of in-house polymerase chain reaction for diagnosis of mycobacterial disease in patients with HIV infection and lung infiltrates. Int.J.Tuberc.Lung.Dis. 2004;8(1):106-13.
5. Lawn SD, Evans AJ, Sedgwick PM, Acheampong JW. Pulmonary tuberculosis: radiological features in West Africans coinfecting with HIV. Br. J. Radiol. 1999 Apr;72:339-44.
6. Bakhshayesh-Karam M, Tabarsi P, Mirsalehi SM, Amiri MV, Zahirifard S, Mansoori SD, et al. Radiographic Manifestations in TB/HIV Patients. Tanaffas. 2004; 3(9):33-9.
7. Leung K.I, Yip CW, Cheung WF, Lo ACT, Ko WM, Kam KM. Development of a simple and a low-cost real-time PCR method for the identification of commonly encountered mycobacteria in a high throughput laboratory. J. Appl. Microbiol.,2009 :1364-77.
8. Goodman L, Felson B. Felsons. Principles of Chest Roentgenology, 2006, third edition.
9. Altman D. Practical Statistics for Medical Research.1991, Great Britain, London.
10. Garcia GF, Moura AS, Ferreira CS, Rocha MO. Clinical and radiographic features of HIV-related pulmonary tuberculosis according to the level of immunosuppression. Rev.Soc.Bras.Med.Trop.2007;40(6):622-26.

11. Greemberg SD, Frager D, Suster B, Walker S, Stavropoulos C, Rothpearl A. Active pulmonary tuberculosis in patients with AIDS: spectrum of radiographic findings(including a normal appearance). *Radiology*. 1994 Oct;193:115-19.
12. Picon PD, Caramori MLA, Bassanest SL, Jungblut S, Folgierini M, Porto NS, et al. Differences in the clinical and radiological presentation of intrathoracic tuberculosis in the presence or absence of HIV infection. *J.Bras.Pneumol*.2007;429-36.
13. Santo LA, Santos PCH, Moreira ME. Perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes com tuberculose em hospital universitário da região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. Departamento de Medicina. Universidade de Taubaté. *Bepa*. 2009;6(68):14-21.
14. Fonseca MGP, Bastos FL. Twenty-Five years of the AIDS epidemic in Brazil: principal epidemiological findinds,1980-2005. *Cad. Saúde Pública*. 2007 Mar;23(3):333-44.
15. Kriski AL, Dalcolmo M. Bianco R, Melo FF. Associação tuberculose e infecção pelo HIV no Brasil. *Boletim de La Oficina Sanitaria Panamericana*. 1995; 118:542-54.
16. Lima MFS, Melo HRL. Hepatotoxicity induced by antituberculosis drugs among patients coinfect with HIV and tuberculosis. *Reports in Public Health* 2012; 28, 698-708.
17. Conde MB, Soares SLM, Mello FC. Comparison of Sputum Induction with Fiberoptic Bronchoscopy in the Diagnosis of Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Car. Med*. 2000 Dec;162(6):2238-40.
18. Parry CM, Kamoto O, Harries AD. The use of sputum induction for establishing a diagnosis in patients with suspected pulmonary tuberculosis in Malawi. *Tuber. Lung. Dis*. 1995 Feb;76(1):72-6.

6. CONCLUSÕES

A qPCR realizada em amostra de escarro apresentou sensibilidade, especificidade e acurácia satisfatórias, sendo útil para o diagnóstico da TBP em pacientes com HIV/aids.

O exame radiográfico de tórax demonstrou ser inespecífico, exceto quando o padrão de cavidade e infiltrado micronodular difuso estão presentes, não sendo recomendado como método isolado para diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes coinfectados HIV/MTB.

7. REFERÊNCIAS

ACETI, Antonio et al. Identification of HIV patients with active pulmonary tuberculosis using urine based polymerase chain reaction assay. **Thorax**, London, n. 54, p. 145-146, 1999. Disponível em: <<http://thorax.bmj.com/content/54/2/145.full.pdf+html>>. Acesso em: 30 abr. 2012.

ALTMAN, D. G. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman and Hall, 1991. 611 p.

BABA, K. et al. Real-time quantitative PCR in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded pleural tissue in patients from a high HIV endemic area. **Diagn.Mol.Pathol.**, [S.l.], v.17, n. 2, p. 112-117, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382372>>. Acesso em: 10 jan 2012.

BOEHME, C. C. et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. **N. Engl. J. Med.**, [S.l.], v. 363, n. 11, Sept. 2010. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0907847>>. Acesso em: 10 jan 2012.

BOFFO, M. M. S.. et al. Tuberculose associada à AIDS: características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes atendidos em um serviço de referência do sul do Brasil. **J. Bras. Pneumol.**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 140-146, mar./abr. 2004.

BOLETIM DST/AIDS, GOVERNO DE PERBAMBUCO. Secretaria de Saúde. Programa Estadual DST / AIDS, ano 6, n. 1, abr. 2012.

BURMAN, W. et al. Frequency, severity and duration of immune reconstitution events in HIV – related tuberculosis. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, [S.l.], v. 11, n. 12, p. 1282-1289, 2007. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2007/00000011/00000012/art00004>>. Acesso em: 12 dez 2011.

CANNAS, A. et al. Mycobacterium tuberculosis DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, [S.l.], v.12, n.2, p. 146-151, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18230246>>. Acesso em: 12 dez 2011.

CLEEFF, M. et al. Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, [S.l.], v. 9, n. 8, p. 877-883, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104634>>. Acesso em: 20 fev 2009.

CONDE, M. B. et al. Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis: experience at an acquired Immune Deficiency Syndrome Reference Center in Rio de Janeiro, Brazil. **Am. J. Respir. CRIT. Can. Med.**, [S.l.], v. 162, p. 2238-2240, 2000. Disponível em: <<http://ajrccm.atsjournals.org/content/162/6/2238.full.pdf+html>> . Acesso em: 15 maio 2009.

DALCOLMO, M.; MELO, F. F.; PINTO, W. P. Tuberculose. In: ZAMBONI, M.; CASTRO, C. A. P. **Pneumologia: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 561-571.

EL-SADR, W. M.; TSIOURIS, S. J. HIV-associated tuberculosis: diagnostic and treatment challenges. **Semin. Respir. Crit. Med.**, [S.l.], v. 29, n. 5, p. 525-531, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18810685>>. Acesso em: 27 fev 2012.

FARAH, S. B. **DNA: segredos e mistérios**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. p.124 – 127.

GAZZOLA, L. et al. The usefulness of PCR assay in diagnosis disseminated mycobacterial infection in AIDS patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, [S.l.], v. 27, n. 2, p. 163-166, 2008. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br.ez16.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=infofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF8&ctx_ver=Z39.882004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=954925570844&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 27 fev 2012.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, [S.l.], v. 25, n. 4, p. 386-401, Dec. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846608>>. Acesso em: 13 ago 2011.

GOPI, A. et al. Diagnosis and treatment of pleural effusion in 2006. **J. Chest**, [S.l.], v. 131, n. 3, p. 880-889, Mar. 2007. Disponível em: <<http://chestjournal.chestpubs.org/content/131/3/880.full.pdf+html>>. Acesso em: 13 mar 2008.

HULLEY, S.; CUMMINGS, S.; BRWNER, W. **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

KIBIKI, G. S. et al. Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for M. tuberculosis in bronchoalveolar lavage fluid. **Trop. Med. Int. Health**, [S.l.], v. 12, n. 10, p. 1210-1217, Oct. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956503>>. Acesso em: 25 set 2008.

KIM, K. et al. Development and application of multiprobe real-time PCR method targeting the hsp65 gene for differentiation of mycobacterium species from isolates and sputum specimens. **J. Clin. Microbiol.**, [S.l.], v. 48, n. 9, p. 3073-3080, Sept. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/48/9/3073.full>>. Acesso em: 13 ago 2011.

KIVIHYA-NDUGGA, L. et al. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. **J. Clin. Microbiol.**, [S.l.], v. 42, n. 3, p. 1012-1015, Mar. 2004. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/42/3/1012.full.pdf+html>>. Acesso em: 12 dez 2008.

KUMAR, M. et al. Efficient Mycobacterial DNA extraction from clinical samples for early diagnosis of tuberculosis. **INT.J.TUBERC.LUNGDis.**, [S.l.], v. 14, n. 7, p. 847-851, Jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Efficient%20mycobacterial%20DNA%20extraction%20from%20clinical%20early%20diagnosis%20of%20tuberculosis>>. Acesso em: 12 jan 2011.

LEUNG, K. I. et al. Development of a simple and a low-cost real-time PCR method for the identification of commonly encountered Mycobacteria in a high throughput laboratory. **J. Appl. Microbiol.**, [S.l.], v. 107, n. 5, p.1433-1439, Nov. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426272>>. Acesso em: 13 maio 2010.

LEMAIRE, J. F.; CASENGHI, M. New diagnostics for tuberculosis: fulfilling patient needs first. **J. Inter. AIDS Soc.**, [S.l.], v. 13, n.40, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2987791/pdf/1758-2652-13-40.pdf>>. Acesso em: 15 fev 2012.

LEMAITRE, N. et al. Comparison of the Real Time PCR method and the gen-probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for detection of mycobacterium tuberculosis in Pulmonary and nonpulmonary specimens. **J. Clin. Microbiol.**, [S.l.], v. 42, n. 9, p. 4307-4309, 2004. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/42/9/4307.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 fev 2008.

LIMA, S. S. S. et al. Métodos convencionais e moleculares para diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 34, n. 12, p. 1056-1062, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v34n12/v34n12a11.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2009.

LORENT, N. et al. Risk factors for delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis at a referral hospital in Rwanda. **Int. j. tuberc. lung. Dis.**, [S.l.], v. 12, n. 4, p. 392-396, Apr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18371264>>. Acesso em: 20 dez 2009.

LU, H. Z. et al. A cross-sectional case study of human immunodeficiency virus and tuberculosis co-infection in mainland China. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**, [S.l.], v. 46, n. 4, p. 280-283, Apr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17637263>>. Acesso em: 10 fev 2008.

MELO, F. A. F. et al. Coinfecção: tuberculose e HIV/AIDS. In: Veronesi, R. **Tratado de Infectologia**. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 1313-1321.

ORTU, S. et al. Rapid detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by Real Time PCR and Bactec 960 MIGT. **The New Microbiol.**, [S.l.], n. 29, p. 75-80, 2006. Disponível em: <http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2006/1/06_Micro6_12_Ortu.pdf>. Acesso em: 28 fev 2008.

PADMAPRIYADARSINI, C.; NARENDRAN, G.; SWAMINATHAN, S. Diagnosis and treatment of tuberculosis in HIV co-infected patients. **Indian J. Med. Res.**, [S.l.], v. 134, n. 6, p. 850-865, Dec. 2011. Disponível em: <<http://icmr.nic.in/ijmr/2011/december/1209.pdf>>. Acesso em: 15 fev 2012.

PARRY, C. M. et al. The use of sputum induction for establishing a diagnosis in patients with suspected pulmonary tuberculosis in Malawi. **Tub. Lung Dis.**, [S.l.], v. 76, n. 1, p. 72-76, Feb. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7718851>>. Acesso em: 10 fev 2008.

PINSKY, B. A.; BANAEI, N. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex members to the species level. **J. Clin. Microbiol.**, [S.l.], v. 46, n. 7, p. 2241-2246, May 2008. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/46/7/2241.full.pdf+html>>. Acesso em: 20 dez 2009.

PINTO JÚNIOR, H. et al. Detecção de Mycobacterium tuberculosis em amostras clínicas por reação em cadeia da polimerase utilizando primers baseados na região intergênica plcB-plcC. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v.33, n. 4, p. 437-442, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v33n4/v33n4a13.pdf>>. Acesso em: 10 fev 2008.

RACHID, M.; SCHECHTER, M. **Manual de HIV/AIDS**. 9. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2008. 222 p.

RAMALHO, R. Cresce o número de pessoas com AIDS no Brasil. **Notícias7**, Brasília, 01 dez. 2010. Disponível em: <<http://noticias.r7.com/saude/noticias/cresce-numero-de-pessoas-com-aids-no-brasil-20101201.html>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

RAVIGLIONE, M. C.; BRIEN, R. J. Tuberculose. In: FAUCI, A. S. **Harrison: medicina interna**. 17. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2009. 2 v.

REWATA, L. et al. Improving diagnosis of pulmonary tuberculosis among HIV/AIDS patients: literature review and experience in a teaching hospital in Indonesia. **Acta Med. Indones**, [S.l.], v. 41, n. 1, p. 57-64, Jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19920300>>. Acesso em: 12 mar 2012.

SECHI, L. A. et. al. Detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR analysis of urine and other clinical samples from AIDS and non – HIV – infected patients. **Mol. Cell. Probes.**, [S.l.], v. 11, n. 4, p. 281-285, Aug. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Detection%20of%20Mycobacterium%20tuberculosis%20by%20PCR%20analysis%20of%20urine%20and%20other%20clinical%20samples%20from%20AIDS%20and%20non%20E2%80%93%20HIV%20%E2%80%93%20infected%20patients>>. Acesso em: 20 dez 2008.

SCHIJMAN, A. G. et al. Prospective evaluation of in-house polymerase chain reaction for diagnosis of Mycobacterial disease in patients with HIV infection and lung infiltrates. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 106-113, 2004. Disponível em: <http://docstore.ingenta.com/cgi-bin/ds_deliver/1/u/d/ISIS/68564059.1/iatld/ijtlid/2004/00000008/00000001/art00015/>

4B5613C6D88692E81335815673B81AC1BE983E51E8.pdf?link=http://www.ingentaconnect.com/error/delivery&format=pdf>. Acesso em: 20 dez 2008.

SCHERER, L.C. et al. Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection. **BMC Pulm. Med.**, [S.l.], v. 11, n. 15, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2466-11-15.pdf>>. Acesso em: 12 mar 2012.

SINGH, S. et al. Nontuberculosis Mycobacterial infections in Indian AIDS patients detected by novel set of ESAT-6 polymerase chain reaction primers. **J. Infect. Dis.**, [S.l.], v. 60, p. 14-18, 2007. Disponível em: <<http://www0.nih.go.jp/JJID/60/14.pdf>>. Acesso em: 20 dez 2008.

TAKAHASHI, T. et al. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for Mycobacterium tuberculosis DNA: clinical application for diagnosis of tuberculosis meningitis **J. Clin. Microbiol.**, [S.l.], v. 46, n. 5, p. 1698-1707, May 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395115/?tool=pubmed>>. Acesso em: 20 dez 2009.

UNAIDS. **Global Report:** UNAIDS report on global AIDS epidemic 2010. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2010.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) **Global Tuberculosis Control:** WHO Report. Geneva, Suíça; 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/ghodata/>. Acesso em 31/03/2012.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis.** 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p.529-663.

APÊNDICE A- QUESTIONÁRIO DA PESQUISA

Avaliação da técnica de PCR em tempo real para diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com HIV/ Aids.

I- IDENTIFICAÇÃO:

Instituição:

Identificação:

Reg.:

Sexo: ()Masc. ()Fem.

Idade:

Data Nasc.:

Escolaridade: Grupo() Grupos: 1) analfabeto; 2) 1- 4 anos estudo; 3) 5-9 anos estudo 4) 10-14 anos estudo; 5) mais de 15 anos estudo.

Profissão:

Procedência:

Estado Civil:

II- Condições Clínicas (no momento da pesquisa), descrever HDA.

Anorexia() **Perda ponderal**() **Mal estar geral**() **Astenia**()

Febre sem padrão definido() **Febre vespertina**() **Há qtº tempo?**-----

Sudorese noturna() **Necessária troca de roupa?** () **SIM** () **NÃO**

Tosse seca() **Tosse produtiva**() **Há qtº tempo?**-----

Hemoptóicos() **Dispnéia**()

Infecções oportunistas associadas?

()Candidíase oroesofageana ()Neurotoxoplasmose ()Tuberculose pulmonar (

)Tuberculose ganglionar ()Tuberculose pleural ()Tuberculose disseminada (

)PPJ ()Meningite Criptocócica ()Encefalite herpética ()Encefalopatia pelo HIV (

) Encefalopatia pelo CMV ()LEMP ()Sarkoma Kaposi ()Criptosporidiose

intestinal ()Isosporíase ()Microporidiose

()Outras,Citar:_____

III- Epidemiologia:

- () Homossexual masculino () UDI
 () Heterossexual () Hemotransfundido
 () Bissexual () Profissional de saúde
 () Desconhecido
 () **Tabagismo** () **Alcoolismo**

IV- Laboratório:

Anti- HIV- data: CD4: CV/HIV:

PCR em tempo real no escarro: () negativo () positivo: titulação: _____

Cultura de escarro para micobactéria: LJ () negativo () positivo

Cultura de escarro para micobactéria : 7H9 () negativo () positivo

Espécie: M.tuberculosis() Outras espécies() _____

Antibiograma: _____

Exame de escarro: BK () negativo () positivo

RX de tórax: _____

Tomografiatórax:

PPD: () negativo () positivo _____

LCR (Meningites): _____

Apresenta Tb extrapulmonar? () NÃO () SIM , Citar local:_____.

Tratamento anterior para TB? SIM() NÃO() ABANDONO() citar período(s):_____

Resposta ao tratamento de TB(período da pesquisa)? SIM() NÃO()

Esquema RIP/RIPE:

Melhora da febre: menos de 5 dias() de 5 a 10 dias() de 10 a 15 dias()

Melhora da tosse: menos de 5 dias() de 5 a 10 dias() de 10 a 15 dias()

Ganho ponderal: menos de 5 dias() de 5 a 10 dias() de 10 a 15 dias()

Bem estar (subjetivo): menos de 5 dias() de 5 a 10 dias() de 10 a 15 dias()

Não foi iniciado tratamento para TB()

APÊNDICE B- Métodos Laboratoriais

M1. Coleta do escarro.

Os escarros foram coletados em potes de polipropileno estéreis e enviados ao laboratório em caixas de isopor contendo gelo. Os espécimes aquosos não purulentos ou mucoides, saliva, foram descartados e eventualmente substituídos por outros adequados.

M2. Digestão e descontaminação dos escarros

Nestes processos utilizou-se o método N-acetil cisteína hidróxido de sódio (NALC-NaOH) como previamente descrito (1. Man. Clin. Microb.).

Reagentes.

Digestor: misturar 50 ml de uma solução esterilizada 0,1 M de citrato trissódico com 50 ml de uma solução de NaOH a 4 %. A mistura é esterilizada e armazenada para uso ulterior. Imediatamente antes do uso adicionam-se à mistura 0,5 g de NALC.

Tampão de fosfato 0,067 M, pH 6,8. Misturar 50 ml da solução A (0,067 M Na₂HPO₄; 9,47 g do sal anidro em 1 l de água destilada) com 50 ml da solução B (0,67 M KH₂PO₄; 9,07 g do sal anidro em 1 l de água destilada). Se necessário o pH pode ser ajustado adicionando-se à mistura A para elevar ou B para baixar. provido de rolha conta-gotas

Procedimento: Aproximadamente 2 a 4 ml do escarro foi transferido para tubo de polipropileno graduado de 50 ml e adicionou-se cuidadosamente igual quantidade da solução NALC-OHNa. Fechou-se o tubo e agitou-se em “shaker” durante 15 min. Adicionou-se a solução tampão e centrifugou-se a 3000 X g por 15 a 20 min. Decantou-se o líquido sobrenadante em reservatório contendo desinfetante. O sedimento obtido foi utilizado para o preparo de estiramentos em lâmina para a pesquisa direta de bacilos álcool ácido-resistentes (BAAR), cultura e testes moleculares.

Pesquisa direta de BAAR: os estiramentos em lâmina foram secos ao ar, fixados durante 5 min em metanol e submetidos à coloração de Ziehl-Neelsen.

Reagentes.

Fucsina fenicada: depositou-se em graal 0,3 g de fucsina básica e adicionaram-se 10 ml de álcool etílico 95°. A essa mistura adicionaram-se lentamente 5 g de fenol fundido e em seguida 100 ml de água destilada. A solução corante foi deixada em repouso por 24 h, filtrada e conservada em frasco escuro provido de rolha conta-gotas.

Solução álcool-ácido: misturar 3 ml de ácido clorídrico (d = 1,19) com 97 ml de álcool etílico 95°. Conservar em frasco provido de rolha conta-gotas.

Solução de azul de metileno: dissolveu-se em álcool etílico a 95% 0,3 g de azul de metileno e em seguida adicionaram-se 100 ml de água destilada.

Procedimento: cobriu-se a lâmina totalmente com a fucsina e aqueceu-se até a emissão de vapores. Completou-se a cobertura da lâmina com fucsina, se necessário, e repetiu-se o aquecimento por mais duas vezes.

Cultura: utilizaram-se para o cultivo de micobactérias o meio sólido de Lowenstein-Jensen (Difco etc) e o meio líquido 7H9 enriquecido com albumina bovina, glicose, catalase e ácido oléico (OADC; Becton-Dickinson Co. MD – USA) e contendo uma mistura de antibióticos, polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina (PANTA; Becton-Dickinson). Esses meios de cultivo foram preparados como prescrito pelos fabricantes.

Procedimento: os tubos contendo os meios foram inoculados com aproximadamente 20 uL do sedimento descontaminado, usando-se para isso uma alça de nicrome. Os tubos foram incubados a 37° C e as leituras realizadas após 7 dias de incubação, com o objetivo de detectar eventual micobactéria crescedora rápido, e em seguida após 30 e 60 dias, antes de descartadas como negativas.

Identificação dos isolados: na identificação das culturas empregou-se a PCR em tempo real, ensaio *in house*. A plataforma utilizada foi a TaqMan com o desenho dos iniciadores e sondas desenvolvidos e validados anteriormente (3. Lemaitre).

Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos: utilizou-se o método das Proporções, opção indireta, como preconizado (2). As drogas foram adicionadas a meio de Lowenstein-Jensen nas seguintes concentrações: estreptomicina 4, isoniazida 0,2, rifampicina 40 e etambutol 4 µg / ml. Os meios de Lowenstein-Jensen com e sem drogas foram *coagulados* a 80° C durante 45 min. Os testes de sensibilidade à pirazinamida, 200 ug / ml, foram realizados em meio 7H9 OADC com o pH ajustado para 5,5.

Procedimento: transferiu-se com alça de nicrome (1µl) pequena porção da cultura bacteriana do meio de Lowenstein-Jensen para para 1 ml de salina em tubo de hemólise esterilizado e agitou-se fortemente em “shaker”. Deixou-se em repouso por 1 min para sedimentação de eventuais aglomerados e transferiu-se o sobrenadante, turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland, para outro tubo de hemólise. Os meios de cultivo com e sem drogas foram inoculados usando-se alça de nicrome de 10 µL. Como controle para avaliação da proporção de colônias resistentes, o inóculo bacteriano, diluído 1:100, foi também inoculado em meios sem droga. A cultura foi considerada resistente quando a quantidade de colônias observada nos meios contendo droga foi igual ou superior à observada no meio controle inoculado com a suspensão bacteriana diluída 1:100.

Apêndice C- Termo de Consentimento e Livre Esclarecimento

O Senhor (a) está sendo convidado(a) para participar como voluntário(a) em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final este documento, que está em duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS./UFPE) pelo telefone 21268588.

Informações sobre a pesquisa:

Título: Avaliação da Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real para diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com HIV/Aids.

Pesquisador responsável: Dr^a Yvana Albuquerque, celular 99764400.

Telefone para contato: 31843980 (Amb. AIDS Hospital Correia Picanço).

Pesquisadora orientadora: Prof^a Dr^a Vera Magalhães.

Telefone para contato: 21263633 (Hospital das Clínicas DIP/HC-UFPE).

Descrição da pesquisa:

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar se é possível diagnosticar a tuberculose pulmonar através de um exame de laboratório que se chama Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real examinando amostra de escarro. A tuberculose é causada por uma bactéria que se chama *Mycobacterium tuberculosis*, esta infecção é muito comum nos pacientes soropositivos para o HIV, sendo uma importante causa de adoecimento e óbito entre os doentes HIV positivos, podendo acometer pacientes com linfócitos T CD₄ baixo ou alto. O diagnóstico da tuberculose nos doentes com aids é difícil de ser estabelecido, o exame de escarro para pesquisa de BK, utilizado rotineiramente só é positivo em 60% das culturas positivas de escarro, os resultados da cultura são demorados, necessitando de quatro a oito semanas para serem obtidos, essas dificuldades associadas a gravidade das manifestações clínicas apresentadas por estes doentes tem favorecido o início do tratamento empírico com drogas antituberculosas. Tal conduta favorece a uma série de complicações, não apenas pela toxicidade das drogas antituberculosas, mas também pela interação entre estes medicamentos e os anti-retrovirais, gerando dificuldade para o paciente tomar as medicações. Na última década surgiram testes para detectar o DNA de bactérias, a chamada PCR, este exame tem sido sugerido como uma técnica que poderia auxiliar o diagnóstico de várias doenças, inclusive a tuberculose. Recentemente a PCR em tempo real, tem sido indicada como sendo uma técnica mais rápida, mais sensível, mais fácil de ser desenvolvida e com menor risco de contaminação do ambiente, podendo diagnosticar a tuberculose pulmonar em horas, permitindo que o tratamento seja realizado corretamente. Trazendo um benefício adicional para os pacientes, pois, possibilitará diagnósticos mais rápidos, diminuindo assim, os riscos de complicações, comuns nestes doentes, com conseqüente necessidade de hospitalização e também reduzindo a transmissibilidade da doença.

O Senhor (a) não é obrigado (a) a participar desta pesquisa, caso deseje recusar não haverá qualquer problema, irá continuar com seu acompanhamento médico e tratamento, sem prejuízo algum; porém, se desejar participar voluntariamente saiba que todas as informações fornecidas serão mantidas em segredo e sua identidade nunca será revelada. Se quiser participar e depois resolver desistir, não haverá qualquer problema para seu tratamento.

Em caso de interrupção da pesquisa as condições éticas já referidas serão mantidas.

Para participar será necessário responder algumas perguntas de um questionário que ficarão sob a responsabilidade da pesquisadora responsável e também haverá a necessidade de coletar uma amostra de escarro. Será coletado o primeiro escarro da manhã, antes da higiene oral, em recipiente esterilizado este material será enviado ao Laboratório Marcelo Magalhães, nesta cidade, onde o escarro será descontaminado e dividido em dois microtubos um para cultura da bactéria e outro para realização da PCR em tempo real. Os riscos do exame em amostra de escarro são mínimos e pouco frequentes, pode-se citar a coleta inadequada do material, o que poderá dificultar o diagnóstico, para minimizar esta possibilidade os pacientes serão esclarecidos como deverão realizar esta coleta de forma satisfatória. Após a realização dos exames os materiais serão desprezados pelo laboratório, como é feito com os outros escarros coletados para exames, seguindo às normas vigentes para este tipo de material biológico. Os resultados dos exames serão enviados ao seu médico.

Dr^a Yvana Albuquerque (responsável pela pesquisa) ou
Prof^a Dr^a Vera Magalhães (pesquisadora orientadora)

Consentimento de participação da pessoa como sujeito Eu, _____, RG/CPF _____, abaixo assinado concordo em participar do estudo VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR EM PACIENTES COM HIV/AIDS, como sujeito. Fui devidamente informado (a) pelo pesquisador responsável sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os presentes riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento.

Recife, ___/___/_____

Nome do sujeito ou responsável

Presenciamos a solicitação de consentimento e esclarecimento sobre a pesquisa.

Testemunha

Testemunha

Observações complementares:

APÊNDICE D

Quantitative real-time PCR (q-PCR) for sputum smear diagnosis of pulmonary tuberculosis among people living with HIV/AIDS.

Yvana Maria Maia de Albuquerque¹, Ana Luiza Magalhães de Andrade Lima³, Ana Kelly Lins², Marcelo Magalhães², Vera Magalhães^{1,2}

1. Tropical Medicine Post-graduation, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil. 2. Laboratório Marcelo Magalhães, Recife-PE, Brasil. 3. Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife-PE, Brasil.

Keywords: HIV/AIDS/ tuberculosis co-infection, diagnosis, real time PCR.

Abstract

Objective: To assess quantitative real-time polymerase chain reaction (q-PCR) for the sputum smear diagnosis of pulmonary tuberculosis (PTB) in patients living with HIV/AIDS with a clinical suspicion of PTB. Method: This is a prospective study to assess the accuracy of a diagnostic test, conducted on 140 sputum specimens from 140 patients living with HIV/AIDS with a clinical suspicion of PTB, attended at two referral hospitals for people living with HIV/AIDS in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. A Löwenstein-Jensen medium culture and 7H9 broth were used as gold standard. Results: Of the 140 sputum samples, 47 (33.6%) were positive with the gold standard. q-PCR was positive in 42 (30%) of the 140 patients. Only one (0.71%) did not correspond to the culture. The sensitivity, specificity and accuracy of the q-PCR were 87.2%, 98.9% and 95% respectively. In 39 (93%) of the 42 q-PCR positive cases, the CT (threshold cycle) was equal to or less than 37. Conclusion: q-PCR performed on sputum smears from patients living with HIV/AIDS demonstrated satisfactory sensitivity, specificity and accuracy, and may therefore be recommended as a method for diagnosing PTB.

Résumé

l'Objectif : évaluer la réaction en chaîne par polymerization en temps réel ("qPCR"/ ACP) pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire (TBP) dans les expectorations de patients avec VIH/SIDA et cas suspects de TBP. la Méthode : C'est une étude prospective qui sert à évaluer la précision du test de diagnostique. Ce test a été effectué sur 140 échantillons de crachats de patients atteints du SIDA et suspects de tuberculose. Ils étaient traités dans deux hôpitaux spécialisés à Recife/Pernambuco au Brésil. La culture sur milieu de Löwenstein-Jensen et 7H9 ont été utilisées comme étalon-or. le Résultat : sur les 140 échantillons, 47(33,6%) positifs sur l'étalon-or. La "qPCR" a été positive dans 42 cas(30%). Seulement 1 cas (0,71%), la "qPCR" n'a pas été égale à la culture (l'étalon-or). La sensibilité, la spécificité et la précision de "qPCR" étaient à 87,2%, 98,9% et 95%, respectivement. Sur les 42 cas positifs ("qPCR"), 39(93%) le CT("threshold cycle") est égal ou inférieur à 37. La Conclusion : la "qPCR" dans les échantillons d'expectoration de patients VIH/SIDA et suspects de TBP et a démontré la sensibilité, la spécificité et la précision appropriées. Alors, ce test peut être recommandé comme une méthode de diagnostic de la TBP.

Resúmen

Objetivo: Evaluar la Reacción en Cadena de Polimerasa en tiempo real cuantitativa (qPCR) para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar (TBP) en esputo de pacientes con sida y sospecha clínica de TBP. Método: Se trata de un estudio prospectivo para evaluación de precisión de prueba diagnóstica, realizado en 140 muestras de esputo provenientes de 140 pacientes con sida y sospecha clínica de TBP atendidos en dos hospitales de referencia para atención VIH/sida en Recife-PE, Brasil. Se utilizó

el cultivo en medios Löwenstein-Jensen y 7H9 como estándar de oro. Resultados: De las 140 muestras de esputo, 47 (33,6%) fueron positivas por el estándar de oro. La qPCR fue positiva en 42 (30%) de los pacientes. En apenas un (0.71%) caso no concordó con el cultivo. La sensibilidad, especificidad y precisión de la qPCR fueron 87,2%, 98.9% y 95% respectivamente. De las 42 qPCR positivas en 39 (93%) el CT (threshold cycle) fue igual o inferior a 37. Conclusión: La qPCR realizada en muestra de esputo de pacientes con sida demostró sensibilidad, especificidad y precisión satisfactoria, pudiendo ser recomendada como método de diagnóstico de TBP.

INTRODUCTION

Infection by the human immunodeficiency virus (HIV) is an important risk factor for developing tuberculosis (TB). HIV increases not only the risk of reactivating latent *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) but also the re-infection of the disease (Kibiki et al. 2007). The annual risk of progressing to TB amongst coinfecting patients varies between 5 and 15%, depending on the degree of immunosuppression, against 0.5% and 1% in non-coinfecting patients (Melo et al. 2009).

In most cases, pulmonary tuberculosis (PTB) in those living with HIV/AIDS presents an atypical clinical form, and from a clinical or radiological viewpoint is very often indistinguishable from other opportunistic infections (Kibiki et al. 2007).

Conventional laboratory techniques used for diagnosing PTB, such as the sputum smear test by Ziehl-Neelsen staining, which despite being inexpensive, presents low sensitivity since most coinfecting patients have paucibacillary diseases (Van Cleeff et al. 2004; Kivihya-Ndugga et al. 2004; Scherer et al. 2011). Although culture has a greater sensitivity of between 19 and 96%, and a specificity of 100%, and is the gold standard, it requires between 4 and 8 weeks in order to obtain results (Rewata et al. 2009; Padmapriyadarsini et al. 2011; Scherer et al. 2011).

In daily practice, it is common to prescribe anti-TB drugs for patients living with HIV/AIDS, without any confirmation of TB-disease, due to diagnostic difficulties and severity of symptoms. This conduct frequently leads to the appearance of complications, not only due to the toxicity of anti-TB drugs, but also because of the interaction between these drugs and antiretroviral therapy (ART) (El-Sadr et al. 2008).

Studies have suggested the inclusion of quantitative real-time polymerase chain reaction (q-PCR) as a method that may assist in diagnosing a variety of infections, including that caused by MTB (Lemaitre et al. 2004; Ortu et al. 2006; Espy et al. 2006; Kim et al. 2010). q-PCR eliminates the gel electrophoresis steps in order

to assess the results. Thus, it is a quicker, more sensitive technique, which also presents a lower risk of causing environmental contamination (Giulietti et al. 2001; Kim et al. 2010).

The aim of the present study is to assess q-PCR for confirming a diagnosis of PTB with sputum from patients living with HIV/AIDS and with a clinical suspicion of PTB.

METHODOLOGY

This was a prospective study to assess the accuracy of a diagnostic test, conducted between August 2009 and January 2012. A total of 140 patients were included in the study aged 18 and over, HIV-infected and with a clinical suspicion of PTB, attended at two referral hospitals for HIV/AIDS in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. Patients were excluded from the study if they were taking anti-TB drugs or were unable to provide sputum samples for the study.

All patients tested HIV-positive, conducted by enzyme immunoassay (ELISA, Abbott Laboratories) and confirmed by immunofluorescence or Western blot, as required by the Ministry of Health (Ordinance nº59).

A sputum sample was collected from each patient. With patients who were unable to produce sputum spontaneously, sputum induction was performed with nebulized 3% hypertonic saline, for 20 minutes, with the aim of obtaining suitable material for the tests (Parry et al. 1995; Conde et al. 2000). Collected data was stored in the study's database.

Sputum decontamination was undertaken with the NaOH-N-acetyl cysteine method. With the obtained sediment, slides were prepared for direct testing, performed with the Ziehl-Neelsen staining technique, and seeded in Löwenstein-Jensen solid medium (LJ (Difco-USA)) and 7H9 broth (Becton-Dickinson Co. MD-USA). The remaining sediment was maintained at -80°C until conducting the q-PCR to identify the DNA of the MTB complex.

The cultivated material was examined twice per week during the first two weeks and once per week until completing eight weeks. The culture, gold standard, was considered positive when at least one of the media presented mycobacterial growth. Furthermore, to confirm the identity of the species *M. tuberculosis* within the

MTB complex, a commercial niacin accumulation test was performed (Becton, Dickinson).

The q-PCR methodology used was previously published by Lemaitre et al. (2004) and involved:

Step 1: Extraction of DNA from sputum: Tissue Protocol using the QIAamp DNA mini kit, following manufacturer's recommendations, manufactured by Qiagen, Hilden, Germany.

Step 2: DNA Amplification: In summary: Primers and probes were used for IS6110 (Gene Bank No. X52471), designed from Primer Express Software, 2.0 (BIOSYSTEMS), obtained from Applied Biosystems, Warrington, UK. The nucleotide sequences of the primers were: 5'-CCGAGGCAGGCATCCA-3' (position 1062 to 1077) and 5'-GATCGTCTCGGCTAGTGCATT-3' (position 1112 to 1132). The sequence of the probe was 5'-FAM-TCGGAAGCTCCTATGAC-MGB-3' (position 1095 to 1111).

PCR amplification was performed in triplicate with a total volume of 25 µl containing the TaqMan Universal PCR master mix 2X (Applied Biosystems), with 300 nM of each primer, 200 nM probe and 5µl of extracted DNA. A BioRad iCycler IQ 5 Thermal Cycler was used, with the following conditions: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C and 50 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The q-PCR was analyzed with Bio-Rad iQ5 1.0 software. For each reaction, positive and negative controls were used.

All positive culture tests for mycobacteria and q-PCR negative tests for MTB were submitted to the q-PCR test to identify MTB complexes, *M.avium-intracellulare*, *M.chelonae/abscessus* and *M.kansasii*, using primers and probes designed by Leung et al. 2009.

Patients were assessed at the moment of collecting the material, reassessed after the culture results, observing the response to anti-TB treatment.

In order to undertake data analysis, rates were obtained for sensitivity, specificity, positive predictive values, negative predictive values and accuracy. The Kappa index was used to compare the LJ and 7H9 media. The Pearson's chi-squared test was used to assess the association between categorical variables; a 5% margin of error. The program used for typing in all data and for obtaining the calculations was SPSS 17.

The present study was approved by the Ethics Committee at the Centro de Ciências da Saúde at Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Protocol No 01.470.172.000-09

RESULTS

A total of 140 sputum specimens from 140 patients living with HIV/AIDS with a clinical suspicion of PTB were analyzed. Of these, 47(33.6%) were confirmed by culture, and 78 (55.7%) were male. Ages ranged from 19 to 64 years, a mean age of 37.13 years, a median of 36 years and a standard deviation of 9.86 years.

With regard to cultures, 42 (30%) were positive in the solid and liquid media, three (2.14%) were positive only in LJ and two (1.4%) were positive only in 7H9. There was one (0.7%) contamination in LJ and two (1.4%) in 7H9. The Kappa index was 0.89. (Table 1).

To assess the sensitivity of the culture, two specialists with more than 20 years experience in infectious diseases, analyzed, separately, clinical data from patient records with negative cultures where anti-TB treatment had been initiated. Ten possible cases of PTB were identified from clinical findings and therapeutic responses, with negative cultures, only one q-PCR registered positive. As two of the ten patients died, thus making it impossible to assess the response to treatment, this left just eight with PTB and a negative culture, where the sensitivity of the culture was 85.4%.

In 37 (26.4%) of the 140 patients, the direct sputum test with Ziehl-Neelsen staining was positive. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy of the direct test was 78.7%, 100%, 100%, 90.3% and 92.8%, respectively (Table 2).

q-PCR was positive in 42 (30%) of the 140 patients. Only one (0.71%) was not in accordance with the gold standard. Sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy of the q-PCR were respectively: 87.2%, 98.9%, 97.6%, 93.9% and 95% (Table 2).

Of the 42 patients with positive q-PCR results, 39 (93%) presented a threshold cycle (Ct) equal to or less than 37. The sensitivity of the q-PCR, considering this Ct value as indicative of positivity, was 92.3%, the PPV was 97.5% and the accuracy was 92.9%. It was not possible to determine the specificity and NPV due to the low frequency (one case) of negative results, when compared to the culture, the gold standard method (Table 2).

The CD4 T-cell count varied between 2 and 1301 cells/mm³ presenting a median value of 148.50. No statistically significant difference was observed between

the q-PCR results and the value of the CD4 cells, $p=0.952$ (Pearson chi-squared test).

Table 1 – Comparison between the culture media used to diagnose PTB from sputum in HIV coinfected patients.

LJ	7H9						TOTAL		Kappa (CI 95%)
	Positive		Negative		Contamination				
	N	%	N	%	n	%	n	%	
Positive	42	30.0	3	2.1	-	-	45	32.1	0.89 (0.81 a 0.97)
Negative	1	0.7	91	65.0	2	1.4	94	67.1	
Contamination	1	0.7	-	-	-	-	1	0.7	
TOTAL	44	31.4	94	67.1	2	1.4	140	100.0	

Table 2 – Comparison between qPCR and the direct test with the results of the culture (gold standard): sensitivity (S), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy (A)

Test	Gold standard		Total	Percentage measurements				
	Positive	Negative		S	Sp	PPV	NPV	A
• PCR-1								
Positive	41	1	42	87.2	98.9	97.6	93.9	95.0
Negative	6	92	98					
Total	47	93	140					
• PCR-2								
Ct Up to 37	39	1	40	92.3		97.5		92.9
CT > 37	2	-	2					
Total ⁽¹⁾	41	1	42					
• BAAR								
Positive	37	-	37	78.7	100.0	100.0	90.3	92.8
Negative	10	93	103					
Total	47	93	140					

(1): PCR was only positive in 42 patients.

DISCUSSION

Of the 140 patients studied with a clinical suspicion of PTB, only 47 (33.6%) confirmed PTB with culture, the gold standard method. However, anti-TB treatment was initiated in 75 (53.6%) patients, 28 (20%) of whom initiated treatment without diagnostic confirmation. A therapeutic response to anti-TB treatment was observed in just 8 (5,7%) of these patients, according to the two specialists who reviewed medical records and considered them PTB cases with a negative culture. Empirical treatment for TB is not uncommon in patients living with HIV/AIDS and respiratory symptoms, due to the high frequency and severity of this coinfection, as well as the difficulty of arriving at a diagnosis with culture. However, this conduct does not always prove beneficial, since co-infected patients present more adverse effects with anti-TB drugs (De Lima & Melo, 2012). Moreover, there may be an interaction between the anti-TB drugs and antiretroviral therapy, which may impose limitations on the therapeutic

response of these patients. These facts reinforce the importance of a rapid, safe diagnostic test, so as to reduce the number of these unnecessary treatments.

Culture was used as the gold standard, performed in liquid and solid media, obtaining high levels of concordance between both, 42 of the 47 positive cultures. Contamination did not affect the results. The two specimens contaminated in 7H9 were negative in LJ and the patients were diagnosed with bacterial pneumonia, with a good clinical response to antibiotic therapy. The only case in which contamination was detected in the LJ media, was later confirmed as PTB, by the 7H9 media, which responded favorably to anti-TB treatment. The use of the two culture media shortens the result time of the culture, since 7H9 provides faster results, and assists in assessing contamination.

The sensitivity and specificity of the direct test were 78.7% and 100% respectively, where sensitivity was higher and specificity similar to other studies. In the direct test, Kibiki et al. (2007) encountered a sensitivity of 66%, while Rewata et al. (2009), encountered 66.7% and Scherer et al. 2011, 60%. The PPV and NPV of the direct test were respectively 100% and 90.3%. The PPV was similar and the NPV was higher to that encountered by Rewata et al. (2009), who obtained a NPV of 83.3%. The high sensitivity of the direct test in the present study is probably related to the method of obtaining the sputum samples. The sputum induction technique was used for 26 (18.6%) patients who were complaining of a dry cough. Induced sputum samples are of good quality, similar to those obtained with bronchoalveolar lavage (BAL) obtained by bronchoscopy (Parry et al. 1995; Conde et al.2000). Furthermore, the direct test was conducted after sputum decontamination and subsequent centrifugation, which may have contributed to the test's greater sensitivity.

The q-PCR demonstrated a sensitivity and specificity of 87.2% and 98.9%, respectively. These findings were similar to those of Kibiki et al. (2007), who performed q-PCR with the BAL of patients living with HIV/AIDS. In Kibiki's study, the results for sensitivity were 85.7% and 96.4% and for specificity were 52.3% and 90.9% with Ct values of 32 and 40. It is important to emphasize that the present study used sputum in the q-PCR assessment, while Kibiki et al. (2007), used BAL. Since similar results were obtained, this would suggest that sputum induction using a nebulizer is equivalent to BAL, demonstrating how this procedure could be useful in regions where it is difficult to perform a bronchoscopy.

Of the 42 positive q-PCRs, only one was not confirmed by culture, this patient supplied a relatively substantial amount of *M.tuberculosis* DNA (Ct = 35) and a satisfactory response to anti-TB treatment, suggesting a failure of the culture. In fact, the sensitivity of the culture, despite being gold standard, may not be so high in paucibacillary patients. The sensitivity of the culture in coinfecting patients varies between 19 and 96% (Rewata et al. 2009).

The population levels of CD4 T-cells cannot be related to the results of the q-PCR. This demonstrates the usefulness of this test for diagnosing PTB at all stages of HIV infection. In patients with advanced AIDS, with low CD4 counts, PTB appears in an atypical form, and may be confused with several other infections (Melo et al. 2009). The early, effective diagnosis of PTB is essential in order to ensure proper patient care, as well as reducing the transmission of MTB (Boehme et al. 2010).

It may be concluded that q-PCR, performed on sputum samples obtained either spontaneously or after induction, yields satisfactory levels of sensitivity, specificity and accuracy. Thus, q-PCR, given that it is a quick technique, is recommended for routine use in the management of patients living with HIV/AIDS.

Acknowledgements: the authors would like to express their gratitude to Laboratório Marcelo Magalhães for their support in performing the sputum smear tests.

BIBLIOGRAPHY

Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D et al. (2010) D. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *New England Journal of Medicine* **363**, 105-1015.

Conde MB, Soares SLM, Mello FCQ et al. (2000) Comparison of Sputum Induction with Fiberoptic Bronchoscopy in the Diagnosis of Tuberculosis: Experience at an Acquired Immune Deficiency Syndrome Reference Center in Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*. **162**, 2238-2240.

De Lima MdFS & de Melo HRL (2012) Hepatotoxicity induced by antituberculosis drugs among patients coinfect with HIV and tuberculosis. *Reports in Public Health* **28**, 698-708.

El-Sadr WM & Tsiouris SJ (2008) HIV-Associated Tuberculosis: Diagnostic and Treatment Challenges. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **29**, 525-531.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM et al. (2006) Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 165-256.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R & Mathieu C (2001) An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* **25**, 386-401.

Kibiki GS, Mulder B, Ven AJAM et al.(2007) Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M.tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid. *Tropical Medicine and International Health* **12**, 1210-1217.

Kim K, Lee H, Lee M et al. (2010) Development and Application of Multiprobe Real-Time PCR Method Targeting the hsp65 Gene for Differentiation of Mycobacterium Species from Isolates and Sputum Speimens. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 3073-3080.

Kivihya-Ndugga L, Van Cleeff M, Juma E et al.(2004) Comparison of PCR with the Routine Procedure for Diagnosis of Tuberculosis in Population with High Prevalences of Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1012-1015.

Lemaitre N, Armand S, Vachée A, Capilliez O, Dumoulin C & Courcol RJ (2004) Comparison of the Real Time PCR Method and the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary and Nonpulmonary Specimens. *Journal of Clinical. Microbiology* **42**, 4307-4309.

Leung KI, Yip CW, Cheung WF, Lo ACT, Ko WM, Kam KM (2009) Development of a simple and a low-cost real-time PCR method for the identification of commonly

encountered mycobacteria in a high throughput laboratory. *Journal of Applied Microbiology* **107**, 1364-77.

Melo FA F, Afiune JB, Hijja MA et al. (2009) Coinfect tuberculosis and HIV/AIDS. In: *Treaty of Infectology*. 4th edn (eds. R Veronesi, R Focaccia) Atheneu, São Paulo, pp. 1313-1321.

Ortu S, Molicotti P, Sechi LA. et al. (2006) Rapid detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by Real Time PCR and Bactec 960 MGT. *The New Microbiology* **29**, 75-80.

Padmapriyadarsini C, Narendran G & Swaminathan (2011) Diagnosis and treatment of tuberculosis in HIV co-infected patients. *Indian Journal of Medical Resarch* **134**, 850-865.

Parry CM, Kamoto O, Harries AD et al. (1995) The use of sputum induction for establishing a diagnosis in patients with suspected pulmonary tuberculosis in Malawi. *Tubercle. and Lung Disease* **76**, 72-76.

Rewata L, Rutherford M, Apriani L et al. (2009) Improving Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis Among HIV/AIDS Patients: Literature Review and Experience in Teaching Hospital in Indonesia. *ACTA Med Indosesian Journal Internal Med.* **41**, 57-64.

Scherer LC, Sperhacke RD, Jaraziwski C et al. (2011) Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection. *BMC Pulmonary Medicine* **11**. <http://www.biomedcentral.com/1471-2466/11/15>.

Van Cleeff M, Kivihya-Ndugga L, Githnui et al. (2005) Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **9**, 877-883.

APÊNDICE E

Alterações radiográficas do tórax de pacientes com HIV/aids e tuberculose pulmonar.

Chest radiographic findings in patients with HIV/AIDS and pulmonary tuberculosis.

Yvana Maria Maia de Albuquerque
 Completing PhD in Tropical Medicine at UFPE
 Infectologist at Hospital Correia Picanço – State Secretariat of Health – PE

Ana Luiza Magalhães de Andrade Lima
 Completing sixth year of medical school - Faculdade Pernambucana de Saúde/FPS
 Receiving Scientific Initiation Scholarship

Ana Carolina Brandão e Silva
 Specialist in Radiology from Colégio Brasileiro de Radiologia-CBR
 Doctor in Radiology - Hospital Correia Picanço – State Secretariat of Health – PE

Eolo Santana de Albuquerque Filho
 Doctor in Radiology at Hospital das Clínicas at UFPE

Ana Rodrigues Falbo
 Public Health Doctor - Escola de Saúde Pública/FIOCRUZ
 Researcher at Faculdade Pernambucana de Saúde-FPS

Vera Magalhães
 PhD in Infectious Diseases - UNIFESP
 Full Professor in Infectious Diseases -UFPE
 Professor on Post-graduation course - Tropical Medicine –UFPE

Study conducted at Hospital das Clínicas-UFPE and Hospital Correia Picanço, Recife-PE.
 Corresponding author : Yvana Maria Maia de Albuquerque. Rua João Cardoso Aires, 267 / 202, Boa Viagem, CEP:51130-300, Recife, PE, Brasil. E-mail: yvana.albuquerque@terra.com

RESUMO

Objetivo: Descrever as principais alterações radiográficas do tórax de pacientes com HIV/aids e tuberculose pulmonar, confirmada através da cultura de escarro. **Método:** Trata-se de estudo descritivo, prospectivo. Foram realizados um total de 140 exames de escarro provenientes de 140 pacientes com HIV/aids com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, desses, 42 pacientes preencheram os critérios estabelecidos pelo estudo e compuseram a amostra. Os pacientes foram atendidos em dois hospitais de referência para HIV/aids no Recife-PE, no período de agosto de 2009 a janeiro de 2012. **Resultados:** A alteração radiológica isolada mais freqüente foi a consolidação parenquimatosa, com seis (14,3%) dos pacientes, seguida pelo infiltrado intersticial, infiltrado micronodular difuso (miliar) e a associação infiltrado com consolidação parenquimatosa, acometendo cinco (11,9%) dos pacientes cada. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os achados radiológicos e a contagem das células T CD₄, p=0,680. **Conclusão:** Os achados radiográficos do tórax foram inespecíficos, não sendo o RX de tórax suficiente como método isolado para sugerir diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com HIV/aids.

ABSTRACT

Objective: To describe the main chest radiographic changes in people living with HIV/AIDS and pulmonary tuberculosis (PTB), confirmed by sputum culture. **Method:** This was a descriptive, prospective study involving a total of 140 sputum tests from 140 people living with HIV/AIDS and a clinical suspicion of PTB. From amongst this group, 42 met the established criteria and were therefore included in the study. All patients attended two referral hospitals in Recife-PE, Brazil, between August 2009 and January 2012. **Results:** The most common isolated radiological change was parenchymal consolidation, encountered in six (14,3%) patients, followed by patterns of interstitial infiltrate, diffuse micronodular (miliary), and an association between interstitial infiltrate and parenchymal consolidation, each being encountered in five (11,9%) patients. No statistically significant difference was observed between the radiological findings and CD₄T-cell counts, p=0.680. **Conclusion:** Chest radiographic

findings were not specific, therefore indicating that chest radiography is not sufficient in itself to establish a diagnosis of PTB in patients living with HIV/AIDS.

Introduction

Tuberculosis (TB) constitutes a serious public health problem worldwide. According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that one third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, with 9.4 million new cases. A total of 1.1 million of these are co-infected individuals with Human Immunodeficiency Virus (HIV) (1).

HIV infection is one of the main risk factors for the development of TB. While there is a 10% risk of *M.tuberculosis* infection developing into the disease throughout the lifetime of immunocompetent persons, in patients living with HIV, this percentage is between 8 and 10 % per year (2). Pulmonary tuberculosis (PTB) may occur at any stage of HIV-infection and coinfecting patients should undergo antiretroviral therapy (ART) (3).

The diagnosis of PTB in patients living with AIDS is difficult, and results for sputum culture, the gold standard method, may take between four and eight weeks. Most patients are paucibacillary and often present a direct sputum negative test (4). Chest radiography is the initial method of choice for imaging and monitoring PTB, and is a routine medical procedure for this group of patients (5). However, reviewing the literature, it may be observed that few studies have been carried out in Brazil to assess the findings of chest radiography with laboratory confirmation for PTB (2,10). It is important to emphasize that in patients with AIDS, the lungs are the most commonly affected organs by infectious processes (viral, bacterial, fungal) and neoplasias, where pulmonary changes are generally nonspecific (6). This makes the clinical/radiological diagnosis of PTB in coinfecting patients more difficult.

A retrospective study in the south of Brazil, aimed at assessing chest radiographic changes in HIV/ *M. tuberculosis* coinfecting patients, reported an interstitial pattern as the most prevalent change, followed by consolidation (2).

The aim of the present study is to describe the main chest radiographic changes in patients living with HIV/aids and PTB, confirmed by sputum culture, in patients attending two HIV/AIDS referral hospitals in the city of Recife.

Method

This was a descriptive, prospective study conducted with HIV/AIDS-infected patients who also presented PTB, attended at two HIV/AIDS referral hospitals in the city of Recife, during the period between August 2009 and January 2012.

The study included patients living with HIV, diagnosed by enzyme immunoassay (ELISA), with antigen produced by recombinant DNA techniques (Abbott Laboratories, Chicago II), with which the infection was confirmed by immunofluorescence or Western blot, and the clinical suspicion of PTB. All patients were 18 years or over, and could either be receiving ART or not. Patients were excluded from the study if they were undergoing anti-TB therapy, suffering from a chronic pulmonary disease or if for any clinical reason, they were unable to provide sputum samples required for the study.

For those patients who were unable to produce sputum spontaneously, sputum induction was performed with nebulized 3% hypertonic saline, for 20 minutes, with the aim of obtaining suitable material for the tests. Each patient provided a sputum sample.

PTB was diagnosed by sputum culture, seeded in Löwenstein-Jensen solid medium (LJ) and 7H9 broth (Bactec) to identify the mycobacteria.

All mycobacteria positive cultures were submitted to real-time quantitative PCR (qPCR) analysis in order to identify and confirm *M.tuberculosis* complex, using primers and probes designed by Leung et al, (7).

Chest radiographs were performed before anti-TB treatment was initiated, with posteroanterior and lateral views. The radiographs were analyzed independently by two radiologists, with more than 20 years experience in chest radiography, who provided reports without any previous knowledge of the patients' clinical condition or laboratory test results. In cases of disagreement, results were defined by consensus between the two specialists.

Personal data, epidemiological and clinical features and undertaken tests, were collected by means of a form specific to this study, and information was obtained through interviews with the patients and/or a review of medical reports.

Chest radiographs were defined as either normal or abnormal. Abnormal findings were classified according to the presence of changes as: interstitial infiltrate, parenchymal consolidation, hilar and/or mediastinal adenopathy, cavity, diffuse

miconodular infiltrate (miliary) and pleural effusion, as well as the association of any two or more of these changes (8).

Data was analyzed with the absolute distributions, the univariate and bivariate percentages and statistical measures: mean, median and standard deviations (descriptive statistics) and the Fisher's Exact test (statistical inference), the margin of error was 5%. The Kappa test was performed to assess concordance between the results of the two radiologists (9). SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), 17 was used to type the data and to obtain the calculations.

The present study was approved by the Ethics Committee at the Center for Health Sciences at UFPE (Registration N° 01.470.172.000-09).

Results

A total of 140 sputum tests were obtained from 140 patients living with HIV/AIDS, with a clinical suspicion of PTB. In 47 samples TB was confirmed by culture. Of these, five (10.6%) were excluded from the study as they had not undergone a chest radiograph. Therefore, the sample consisted of 42 patients.

Isolated PTB was diagnosed in most patients (78.6%), while nine patients (21.4%) indicated an association with an extrapulmonary form, five (11.9%) with lymph node and four (9.5%) disseminated.

Of the 42 patients studied, 22 (52.4%) were male. The age of the participants ranged between 20 and 53 years, with a mean age of 33.6 years.

A productive cough was reported by 34 (81%) patients. A total of 23 (54.8%) patients complained of undefined fever, while 19 (45.2%) patients reported evening fever, followed by weight loss in 32 (76.2%) (Table 1).

A CD₄ T-cell count was conducted in 36 of the 42 patients and varied between 2 and 1.170 cells/mm³, with a mean score of 216.44, a median score of 140.5 and standard deviation of 224.60. The CD₄ T-cell count in 25 (59.5%) patients was lower than 200 cells/mm³. The chest radiograph of the patient with a CD₄ of 2 presented diffuse interstitial infiltrate with areas of consolidation and the patient with 1.170 cells/mm³ presented consolidation in the upper third of the right hemithorax. All patients with diffuse miconodular infiltrate (miliary) had a CD₄ count lower than 200 cells/mm³ (varying between 22 and 157 cells/mm³). However, no significant statistical

difference was observed between the CD₄ T-cell count and the studied radiographic changes, $p=0.680$ (Fisher's Exact test).

The concordance rate in the assessment of the chest radiograph findings described by the two radiologists was considered very good, with a Kappa score of 0.87.

The isolated radiologic change most frequently encountered was parenchymal consolidation, affecting six (14.3%) patients, followed by interstitial infiltrate and diffuse micronodular infiltrate (miliary) each of which affected five (11.9%) patients (Table 2). Cavity was observed in seven (16.7%) patients, three of which (7.1%) reported isolated change, and in another three there was an association to consolidation, and in the seventh patient infiltrate and consolidation were associated with cavity. Hilar adenopathy was observed in only two patients, associated with other changes, and the CD₄ count of these patients was 26cells/mm³ and 143cells/mm³. Pleural effusion was observed in nine (21.4%) patients, and in two (4.8%) of these it was the only change encountered.

TABLE 1 – Main clinical manifestations presented by 42 HIV/TB coinfecting patients.

Clinical Signs	n	%⁽¹⁾
• Fever	42	100.0
Undefined	23	54.8
Evening	19	45.2
• Cough	42	100.0
Dry	8	19.0
Productive	34	81.0
• Weight loss	32	76.2
• Asthenia	30	71.4
• Anorexia	29	69.0
• Generally feeling unwell	25	59.5
• Dyspnea	16	38.1
• Night sweats	11	26.2
• Hemoptysis	5	11.9
• Chest pains	4	9.5

(1): the scores were obtained from the total number of 42 patients analyzed.

TABLE 2 – Radiographic findings of 42 HIV/TB coinfecting patients

Radiographic changes	n	%
Parenchymal consolidation	6	14.3
Interstitial infiltrate	5	11.9
Diffuse micronodular (miliary)	5	11.9
Interstitial + Consolidation	5	11.9
Consolidation + Pleural effusion	4	9.5
Consolidation + Cavity	3	7.1
Pleural effusion	2	4.8
Interstitial + Pleural effusion	2	4.8
Interstitial + Hilar adenopathy	1	2.4
Consolidation + Hilar adenopathy, infiltrate	1	2.4
Interstitial + Consolidation + Cavity	1	2.4
Interstitial + Consolidation + Hilar adenopathy	1	2.4
Normal X-ray	2	4.8
TOTAL	42	100.0

Discussion

In the present study, a mean age of 33.6 years was observed, similar to a number of other Brazilian and US studies (2,10,11). These findings reinforce the argument that HIV/TB coinfections affect younger populations in both developing and developed countries (2,10,12).

No significant difference regarding sex was revealed, a fact already observed in other studies carried out in Brazil (2,10), and is probably a consequence of the fact that today both sexes are affected by HIV infection, unlike the beginning of the epidemic.

As in other studies (5,6,10,12), cough and fever were the most frequent manifestations encountered in coinfecting patients. A productive cough was reported by 81% of patients. Features of the cough are of particular importance in medical practice in order to differentiate between pneumocystis and PTB, two common conditions in people living with HIV/AIDS. In the case of pneumocystis, a dry cough and dyspnea are preponderant, while in PTB a persistent productive cough is observed for more than two weeks and there is an absence of dyspnea. The latter may however be present, at a more advanced stage of PTB, as confirmed by 38.1% of the patients. With regard to fever, most patients (54.8%) did not present a defined pattern, although evening fever is cited as a feature of PTB, most commonly encountered in non-coinfecting PTB patients (13).

The most frequent clinical finding was weight loss (76.2%), which may be explained by AIDS, and is therefore not necessarily related to PTB. Night sweats and hemoptysis, frequently referred to by non-HIV-infected PTB patients, were recorded in only 26.2% and 11.9% respectively. These findings indicate that the clinical manifestations of PTB differ in HIV-infected and non-HIV-infected patients, thus making it difficult to provide clinical diagnosis of the disease in coinfecting patients. In fact, of the 140 HIV/AIDS-infected patients with a clinical suspicion of PTB, the infection was confirmed in only 47 (33.6%). It is important to highlight that although only one sputum sample was used, in the cases where there was not sufficient secretion, sputum induction was performed, which increases test sensitivity, and is similar to bronchial lavage (17,18). Because PTB is one of the most frequent respiratory diseases observed in patients living with HIV in countries where TB is endemic, such as Brazil, empirical anti-TB therapy is common for such patients. Such

a measure is not always beneficial, since it leads to a prolonged period of treatment, with adverse reactions and interactions between the anti-TB and antiretroviral drugs (16). Thus, it becomes even more important to establish a definite diagnosis of PTB in order to justify these risks.

The median CD₄ T-cell count was 140.5 cells/mm³, and in 59.5% of patients the CD₄ was lower than 200 cells/mm³. However, no significant statistical difference was recorded between the CD₄ T-cell count and the radiographic changes encountered. This result differs from the other Brazilian study, in which a significant statistical difference was observed ($p < 0.05$) in the hilar and mediastinal adenopathy findings in patients with a low CD₄ count (2). With regard to chest radiographs, the most frequently encountered isolated impairment was parenchymal consolidation, followed by interstitial infiltrate, diffuse micronodular infiltrate (miliary) and an association of consolidation and infiltrate as the second most frequent radiological changes, with 11.9% in each. With the exception of diffuse micronodular infiltrate, suggestive of miliary TB, the other radiographic patterns are not considered characteristic of PTB, and may be found in bacterial and viral pneumonias, and in fungal infections.

In two (4.8%) chest radiographs of PTB coinfecting patients, there were no changes. These findings are compatible with the low percentages described in the literature, which reports normal chest radiographs in 5 to 10% of HIV-infected patients, rising to 20% when immunodeficiency is accentuated (10).

The cavity, a classic radiological change of PTB, is generally observed in patients living with HIV with normal CD₄ counts. In the present study, it was observed in seven (16.7%) of the 42 patients. In these patients, the CD₄ T-cell count varied between 90 and 672 cells/mm³, with a mean count of 335 cells/mm³. In four of the seven patients who presented cavities, other changes were associated. In the three patients where cavity was observed as the only radiological change, the CD₄ T-cell count was above 350 cells/mm³. For cavity formation, a certain cell immunity is necessary, partly justifying its occurrence in patients with CD₄ above 200 cells/mm³.

Pleural effusion was observed in 21.4% of patients, and in one fourth of these it was the only radiological finding encountered. The CD₄ count of these patients varied between 7 and 672 cells/mm³. In another study conducted in Brazil, most cases of pleural effusion occurred in patients with a CD₄ count lower than 200 cells/mm³ (10). These results differ from the literature, where pleural diffusion is cited

as being more frequent in patients with a CD₄ count higher than 200 cells/mm³, reflecting a more intense pleural reaction (10).

It is important to emphasize that despite the small sample, a prospective study was conducted with radiographic tests assessed by two experienced radiologists and with microbiological evidence of PTB. Most previous studies have been retrospective, with reports taken from medical records and some did not perform a sputum culture to diagnose PTB. Due to the existence of multiple infections observed in patients living with AIDS, many of them with pulmonary involvement, it is difficult to diagnose PTB based only on clinical manifestations and patient radiographs.

It may be concluded that chest radiographs are of little help in diagnosing PTB in patients living with HIV/AIDS, since findings are not specific, except when cavity and diffuse micronodular patterns are encountered, which are suggestive of disease.

Acknowledgements: the authors are grateful to the Laboratório Marcelo Magalhães for their support in conducting the sputum tests.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis control 2010, disponível em: <http://www.int/tb/publications/global-report/2010/en/index.html>, acesso em 21/04/2011.
2. Silva RM, Rosa L, Lemos RN. Alterações radiográficas em pacientes com a co-infecção vírus da imunodeficiência humana/tuberculose: relação com a contagem de células TCD4. J.Bras.Pneumol. 2006;32(3): 228-33.
3. Bakari M, Arbeit RD, Mtei L, Lyimo J, Waddell R, Matee M., et al. Basis for treatment of tuberculosis among HIV-infected patients in Tanzania: the role of chest x-ray and sputum culture. BMC Infect. Dis. 2008 Mar;8(32). Disponível em: [http://www.biomedcentral.com/\(47/-2334/8/32](http://www.biomedcentral.com/(47/-2334/8/32).
4. Schijman Losso MH, Montoto M, Saez CB, Smayevsky, J, Benetucci JA. Prospective evaluation of in-house polymerase chain reaction for diagnosis of mycobacterial disease in patients with HIV infection and lung infiltrates. Int.J.Tuberc.Lung.Dis. 2004;8(1):106-13.

5. Lawn SD, Evans AJ, Sedgwick PM, Acheampong JW. Pulmonary tuberculosis: radiological features in West Africans coinfecting with HIV. *Br. J. Radiol.* 1999 Apr;72:339-44.
6. Bakhshayesh-Karam M, Tabarsi P, Mirsaedi SM, Amiri MV, Zahirifard S, Mansoori SD, et al. Radiographic Manifestations in TB/HIV Patients. *Tanaffas.* 2004; 3(9):33-9.
7. Leung K.I, Yip CW, Cheung WF, Lo ACT, Ko WM, Kam KM. Development of a simple and a low-cost real-time PCR method for the identification of commonly encountered mycobacteria in a high throughput laboratory. *J. Appl. Microbiol.*,2009 :1364-77.
8. Goodman L, Felson B. Felsons. *Principles of Chest Roentgenology*, 2006, third edition.
9. Altman D. *Practical Statistics for Medical Research*.1991, Great Britain, London.
10. Garcia GF, Moura AS, Ferreira CS, Rocha MO. Clinical and radiographic features of HIV-related pulmonary tuberculosis according to the level of immunosuppression. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*2007;40(6):622-26.
11. Greemberg SD, Frager D, Suster B, Walker S, Stavropoulos C, Rothpearl A. Active pulmonary tuberculosis in patients with AIDS: spectrum of radiographic findings(including a normal appearance). *Radiology.* 1994 Oct;193:115-19.
12. Picon PD, Caramori MLA, Bassanest SL, Jungblut S, Folgierini M, Porto NS, et al. Differences in the clinical and radiological presentation of intrathoracic tuberculosis in the presence or absence of HIV infection. *J.Bras. Pneumol.*2007; 429-36.
13. Santo LA, Santos PCH, Moreira ME. Perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes com tuberculose em hospital universitário da região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. Departamento de Medicina. Universidade de Taubaté. *Bepa.* 2009;6(68):14-21.
14. Fonseca MGP, Bastos FL. Twenty-Five years of the AIDS epidemic in Brazil: principal epidemiological findings,1980-2005. *Cad. Saúde Pública.* 2007 Mar;23(3):333-44.
15. Kriski AL, Dalcolmo M. Bianco R, Melo FF. Associação tuberculose e infecção pelo HIV no Brasil. *Boletim de La Oficina Sanitaria Panamericana.* 1995; 118:542-54.

16. Lima MFS, Melo HRL. Hepatotoxicity induced by antituberculosis drugs among patients coinfect with HIV and tuberculosis. *Reports in Public Health* 2012; 28, 698-708.
17. Conde MB, Soares SLM, Mello FC. Comparison of Sputum Induction with Fiberoptic Bronchoscopy in the Diagnosis of Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Car. Med.* 2000 Dec;162(6):2238-40.
18. Parry CM, Kamoto O, Harries AD. The use of sputum induction for establishing a diagnosis in patients with suspected pulmonary tuberculosis in Malawi. *Tuber. Lung. Dis.* 1995 Feb;76(1):72-6.

ANEXO A: Este artigo foi elaborado a partir da pesquisa que gerou esta tese.

Aceito para publicação pelo **J.Bras.Pneumol.** em 15/02/12. Publicação prevista para agosto/12.

Criptosporidiose pulmonar em pacientes com aids, uma doença subdiagnosticada

Pulmonary cryptosporidiosis in AIDS patients, an underdiagnosed disease

Yvana Maria Maia de Albuquerque

Doutoranda em Medicina Tropical-UFPE

Mestre em Medicina Tropical-UFPE

Médica Infectologista Hospital Correia Picanço

Marcia Cristina Fraga Silva

Mestre em Medicina Tropical-UFPE

Médica Infectologista Hospital Correia Picanço

Ana Luiza Magalhães de Andrade Lima

Aluna do quinto ano médico da Faculdade Pernambucana de Saúde/FPS

Bolsista de iniciação científica

Vera Magalhães

Doutora em Doenças Infecciosas - UNIFESP

Profª Titular Doenças Infecciosas-UFPE

Profª Pós-graduação Medicina Tropical-UFPE

Endereço para correspondência: Yvana Maria Maia de Albuquerque. Rua João Cardoso Aires, 267 / 202, Boa Viagem, CEP:51130-300, Recife, PE, Brasil.

Criptosporidiose é uma infecção causada pelo protozoário do gênero *Cryptosporidium spp.*, que infecta células epiteliais do trato gastrointestinal dos seres humanos e dos animais. ⁽¹⁾

As manifestações clínicas dependem do estado imune do paciente. Nos imunocompetentes provoca episódios de diarreia auto-limitada, principalmente em crianças da América Latina. Nos pacientes com aids e imunodeficiência avançada, é a causa parasitária mais comum de diarreia prolongada, associada a perda de peso acentuada, podendo evoluir com grave desidratação e distúrbio eletrolítico. ^(1,2)

Na era pré-terapia antirretroviral (TARV), a criptosporidiose intestinal era responsável por 10 a 30% do sintoma diarréico nos pacientes com aids procedentes de países desenvolvidos e 30 a 50% dos doentes nos países em desenvolvimento.

⁽³⁾ Na atualidade, em países desenvolvidos, com baixas taxas de contaminação

ambiental e disponibilidade de TARV potente, a incidência de criptosporidiose intestinal é inferior a um por 100 pessoas/ano entre doentes com aids. ⁽⁴⁾

O comprometimento pulmonar é uma rara complicação da criptosporidiose intestinal, descrita em pacientes imunocomprometidos, a maioria com aids e grave imunodeficiência. ⁽²⁾ A prevalência da criptosporidiose pulmonar, entretanto, pode estar subestimada, por não ser sistematicamente investigada. ⁽⁵⁾ Em estudo prospectivo realizado em 275 pacientes com aids na Espanha, 43 apresentaram enterite por criptosporídio, dos quais em sete identificou-se oocistos de *criptosporidium spp* no exame de escarro. ⁽³⁾

A patogenia da criptosporidiose pulmonar não está totalmente esclarecida. ^(2,6) Discute-se a possibilidade da localização pulmonar resultar da inalação de oocistos durante episódio de vômito ou ser conseqüente a disseminação hematogênica. ⁽²⁾ Apesar dos oocistos de criptosporídio usualmente não invadirem a mucosa intestinal, oocistos deste parasita tem sido encontrados no interior de macrófagos, os quais podem ter sua habilidade fagocítica defectiva. Ademais, este parasita pode se multiplicar nos macrófagos “in vitro”, sugerindo que o parasitismo extraintestinal ocorreria através dos macrófagos circulantes. ⁽⁷⁾ Esta hipótese é sustentada pela presença de *Cryptosporidium spp* no interior dos vasos sanguíneos da submucosa intestinal e pulmonar, evidenciados em estudos de necrópsia. ^(2,7)

As manifestações clínicas da criptosporidiose pulmonar são inespecíficas e incluem habitualmente, tosse crônica, febre e dispnéia como sintomas mais freqüentes, podendo ou não apresentar alterações radiológicas. ⁽²⁾ Apesar de não haver descrição de achado radiológico patognomônico de criptosporidiose pulmonar, tem sido descrito em alguns relatos de casos a presença de opacidade intersticial. ^(2, 3, 7, 8)

Em pesquisa conduzida em hospitais de referência para atendimento de pacientes HIV/aids com suspeita clínica de tuberculose pulmonar em Recife, de um total de 130 exames de escarro realizados até o momento, *Cryptosporidium spp* foi o único agente identificado em dois (1,5%) destes pacientes, o diagnóstico foi realizado através da identificação de oocistos de *Cryptosporidium spp* no exame de escarro corado com Ziehl- Neelsen (Figura 1). Em ambos os casos os pacientes apresentaram febre vespertina, tosse, perda ponderal e mal estar geral, sugerindo o diagnóstico de tuberculose pulmonar. Nos dois casos estudados observou-se grave comprometimento imune, com contagem das células T CD₄ muito baixas (25 e

37cel/mm³), apesar de não ter sido pesquisado *P.jirovecci* foi prescrito profilaxia para este agente com sulfametoxazol / trimetropim. Os dois pacientes tiveram diagnóstico recente de aids e apenas um deles teve suspeita clínica inicial de criptosporidiose intestinal, confirmada através do exame coproparasitológico, enquanto o outro, apresentou clínica sugestiva de tuberculose pulmonar, sem entretanto, referir queixas digestivas. O exame radiográfico do tórax (Figura 2) foi normal nos dois pacientes. As culturas de escarro realizadas utilizando-se os meios Löwenstein-Jensen e 7H9 não evidenciaram crescimento de micobactérias.

Os pacientes evoluíram com melhora clínica, imunológica e virológica progressivas, após início da TARV. Não existe medicamento específico com eficácia comprovada para tratamento da criptosporidiose, estando a melhora clínica relacionada ao estado imune do paciente. ⁽²⁾

Ressalta-se a importância da necessidade da investigação dessa parasitose nos pacientes com aids e clinicamente suspeitos de tuberculose pulmonar, principalmente, nos que apresentarem diarreia prolongada.

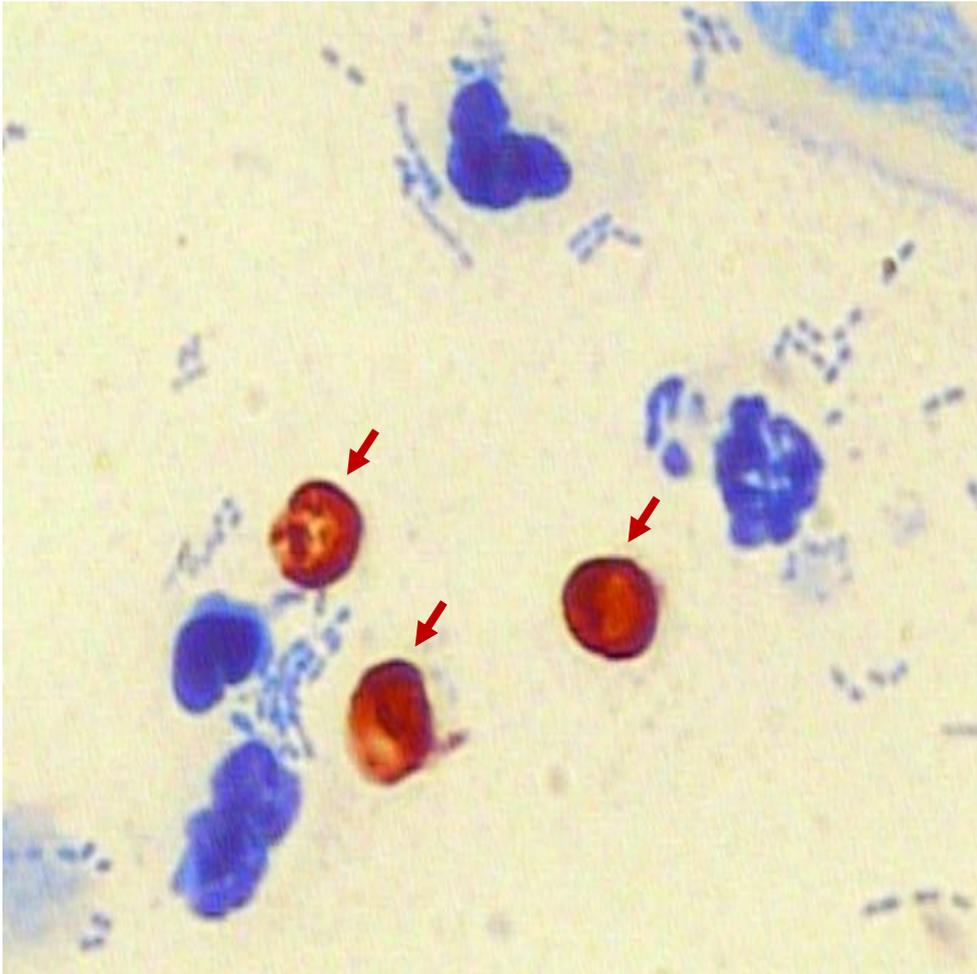
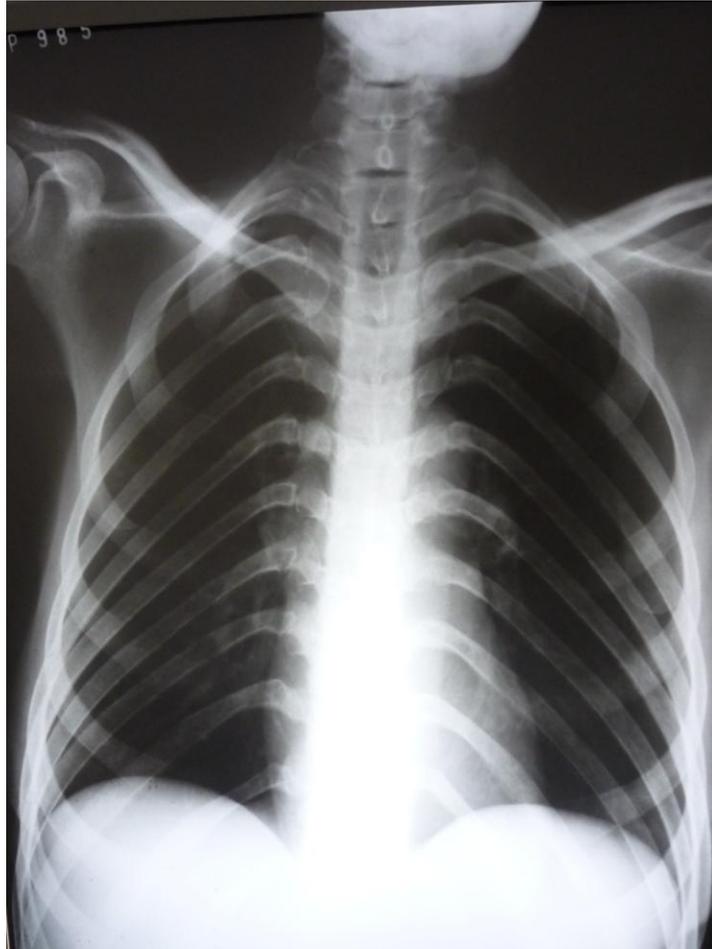


Figura 1: Esfregaço de escarro corado pelo Ziehl-Neelsen, demonstrando oocistos de *Cryptosporidium* spp. (setas vermelhas). Fonte: Banco de imagens da pesquisadora.



**Figura 2: RX tórax paciente aids / criptosporidiose pulmonar.
Fonte: Banco de imagens da pesquisadora.**

Agradecimentos: os autores agradecem ao Laboratório Marcelo Magalhães pelo suporte na realização dos exames de escarro.

Referências

1. Castiblanco CV, Nuñez SS, Santos FF, Mazás EA. La criptosporidiosis en la región andina de Colombia: seroprevalencia y reconocimiento de antígenos. Rev Panam Salud Public. 2000;8(6):373-9.
2. Corti M, Villafane MF, Muzzio E, Bava J, Abuín JC, Palmieri OJ. Criptosporidiosis broncopulmonar em pacientes infectados por el vírus de la inmunodeficiência humana. Rev Argent Microbiol. 2008;40(2):106-8.
3. Lopez-Velez R, Tarazona R, Garcia Camacho A, Gomez-Manpaso E, Guerrero A, Moreira V, et al. Intestinal and extraintestinal criptosporidiosis in AIDS patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1995;14(8):677-81.
4. Bonasser Filho F. Manifestações Gastrintestinais. In: Veronesi FR. editor. Tratado de Infectologia. 4ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2009. p.208-12.
5. Meamar AR, Rezaian M, Rezaie S, Mohraz M, Kia EB, Houbt ER, et al. Cryptosporidium *parvum* bovine genotype oocysts in respiratory samples of an AIDS patient: efficacy of treatment with a combination of azitromycin and paramomycin. Parasitol Res. 2006;98(6):593-5.
6. Poirot JL, Deluol AM, Antoine M, Heyter F, Cadranel J, Meynard JL, et al. Broncho-pulmonary cryptosporidiosis in four HIV infected patients. J Eur Microbiol. 1996; 43(5):794-5.
7. Dupont C, Bougnoux ME, Turner L, Rouveix E, Dorra M. Microbiological Findings about Pulmonary Cryptosporidiosis in Two AIDS Patients. J Clin Microbiol. 1996; 34(1):227-9.
8. Palmieri F, Cicalini S, Froio N, Rizzi EB, Goletti D, Festa A, et al. Pulmonary cryptosporidiosis in AIDS patient: successful treatment with paramomycin plus azithromycin. Int J STD AIDS. 2005;16(7):515-7.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 159/2009 - CEP/CCS

Recife, 16 de junho de 2009

Registro do SISNEP FR – 255428

CAAE – 0147.0.172.000-09

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 150/09

Título: “Validação da Técnica da Reação Em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real Para Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar em Pacientes com HIV/AIDS”.

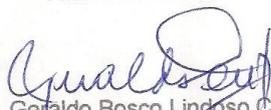
Pesquisadora Responsável: Yvana Maria Maia de Albuquerque

Senhor Pesquisador:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 16 de junho de 2009.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar o relatório ao final da pesquisa.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

A
Doutoranda Yvana Maria Maia de Albuquerque
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – CCS/UFPE