

Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel

*Micobacteriose parotídea na AIDS em fase
avançada: Análise histológica,
imunohistoquímica e caracterização por LCR e
PCR de espécies de Mycobacterium*



UNICAMP

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
Estomatopatologia, Área de Patologia.

Piracicaba

2004

Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel

*Micobacteriose parotídea na AIDS em fase
avançada: Análise histológica,
imunohistoquímica e caracterização por LCR e
PCR de espécies de Mycobacterium*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor
em Estomatopatologia, Área de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Albina Messias de Almeida Milani
Altemani

Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Prof. Dr. Edgard Graner

Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Piracicaba

2004

Ficha Catalográfica

R163m	Rangel, Ana Lúcia Carrinho Ayroza. Micobacteriose parotídea na AIDS em fase avançada: análise histológica, imunohistoquímica e caracterização por LCR e PCR de espécies de <i>Mycobacterium</i>. / Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004. xiii, 86f. : il. Orientador : Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Micobactérias. 2. AIDS (Doença). 3. Diagnóstico. I. Vargas, Pablo Agustin. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

A Deus pela proteção e amor em todos os momentos...

Aos meus amados pais **Gregório e Amy**,
Com todo o meu amor dedico este trabalho!
Agradeço por ter pais como vocês...
que são a minha vida!

Aos meus familiares e aos meus
verdadeiros amigos,
Agradeço pelos bons momentos...
aqueles que realmente fazem a vida valer a
pena!

Ao **Fabício**,

“Sempre existe no mundo uma pessoa que espera a outra, seja no meio do deserto, seja no meio das grandes cidades. E quando estas pessoas se encontram, todo o passado e todo o futuro perdem qualquer importância, e só existe aquele momento!”

Paulo Coelho *De O Alquimista*

Ao meu Orientador **Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**:

Prefiro chamá-lo de amigo, pois esses ficam para a vida toda!

Pablo, obrigada pela confiança, apoio, incentivo!

Ao professor **Oslei Paes de Almeida**, meu eterno respeito, gratidão e
admiração!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho e ao Prof Dr. Pablo Agustin Vargas, coordenador do Programa de Pós-graduação em Estomatopatologia.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos, contribuindo para a realização do doutorado.

Ao Hélio Caiafa e Andréa, responsáveis pelo laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela realização da LCR.

Aos Professores Doutores Maria Cecília Barisson Villares e Marcelo de Carvalho Ramos do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, pela concessão de DNAs utilizados como controles positivos para a PCR.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Emprapa-suínos e aves) pelo doação de blocos utilizados também como controle positivo para a PCR.

Aos Professores da disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba: Jacks Jorge Junior, Osvaldo Di Hipólito Jr e em especial aos Professores Ricardo Della Colleta e Edgard Graner pela orientação na parte laboratorial da pesquisa. Ao Professor Márcio Ajudarte Lopes pela amizade, profissionalismo e bom humor!

Ao Professor Antonio Olavo Cardoso Jorge, exemplo de pesquisador e estímulo durante os primeiros anos de faculdade!

Às minhas amigas Bia, Cassiane, Thaís, Larissa, Rebeca, Trícia, Renata Servidoni: agradeço a amizade de vocês!

À querida França por todo o amor e cuidado durante tantos anos!

À amiga Ana Paula Boconcelo Vargas pela amizade e confiança!

Aos meus colegas de curso Danyel, Eduardo e Fábio Ito pela ajuda na realização da tese!

Aos demais colegas de Pós-graduação que me trarão saudade e boas lembranças: Paulo Bonan, Paulo Faria, Cláudio, Jorge, Sabrina, Karina Neves, Marcelo e Paola.

À Ana Cristina do Amaral Godoy pela amizade e pela realização das reações imunohistoquímicas.

Aos técnicos de laboratório: Adriano Luís Martins, João Carlos G. da Silva e Rosa Maria Fornasiari: obrigada pelos ensinamentos e pela boa vontade sempre encontrada!

“O Bom Combate é aquele que é travado em nome dos nossos
sonhos; foi transportado dos Campos de Batalha para dentro de
nós mesmos”.

Paulo Coelho *De O Diário de um Mago*

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
1. INTRODUÇÃO	03
2. REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1. EPIDEMIOLOGIA DA AIDS	05
2.2. HIV	07
2.3. PATOGENIA DA AIDS	08
2.4. TUBERCULOSE (TB)	10
2.5. EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE	11
2.6. PERFIL IMUNOLÓGICO DA TUBERCULOSE	12
2.7. GÊNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	14
2.8. INFECÇÃO PROVOCADA POR MICRORGANISMOS DO	16
“COMPLEXO <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> ”	
2.9. AIDS E TUBERCULOSE	18
2.10. MORFOLOGIA DA GLÂNDULA PARÓTIDA	22
2.11. TUBERCULOSE NAS GLÂNDULAS SALIVARES	22
2.12. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE TUBERCULOSE	25
2.12.1 Métodos diagnósticos convencionais	25
2.12.2 Métodos diagnósticos moleculares	26
3. PROPOSIÇÃO	35
4. PACIENTES E MÉTODOS	36
4.1. PACIENTES	36
4.2. DADOS OBTIDOS DOS PRONTUÁRIOS HOSPITALARES	36
4.3. COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS	36
4.4. REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS	37
4.5. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	38
4.6. MÉTODOS MOLECULARES	38

4.6.1 Extração de DNA	38
4.6.2 Controles positivos	40
4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
4.6.4 Técnica da Reação em Cadeia da Ligase (LCR) para pesquisa do “complexo <i>M. tuberculosis</i> ”	44
5. RESULTADOS	49
5.1. DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	49
5.2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	50
5.3. REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS	51
5.4. REAÇÃO EM CADEIA DA LIGASE	58
5.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	60
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESUMO

Neste trabalho foram analisados histologicamente 10 casos de micobacteriose parotídea em pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada, assim como foi avaliado o padrão da resposta inflamatória através de reações imunohistoquímicas. Foram realizadas técnicas para a detecção do gênero *Mycobacterium*: coloração de Ziehl-Neelsen, imunohistoquímica para BCG e PCR para amplificação de pequena região de um gene responsável por uma proteína conservada no gênero *Mycobacterium*. Além disso, as espécies de *Mycobacterium* foram caracterizadas a partir de material parafinado, sendo o "complexo *M. tuberculosis*" identificado através da PCR e LCR e o *Mycobacterium avium* através da PCR. A micobacteriose acometeu preferencialmente os linfonodos intraparotídeos (n=10), tendo afetado o parênquima glandular em apenas 3 casos. Foram encontrados 2 padrões histopatológicos na micobacteriose parotídea: o padrão de granulomas mal formados (8 casos) e o padrão macrofágico difuso (2 casos). Avaliando o perfil imunológico da micobacteriose parotídea foi observada uma maior prevalência de macrófagos seguidos por linfócitos TCD8, linfócitos B e linfócitos T CD4. As três técnicas utilizadas para detecção do gênero *Mycobacterium* apresentaram a mesma sensibilidade, sendo positivas para os 10 casos. A detecção do "complexo *M. tuberculosis*" pela LCR foi positiva em 5 dos 10 casos e a PCR em 8 casos. Já a infecção pelo *Mycobacterium avium* foi observada em apenas 1 caso, no qual também foi detectada co-infecção pelo *M. tuberculosis*. A PCR foi mais eficaz do que a LCR para a identificação do "complexo *M. tuberculosis*" além disso, mostrou ser um método diagnóstico eficiente para identificar espécies de *Mycobacterium* em casos de micobacteriose parotídea emblocados em parafina.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the parotid mycobacteriosis by histopathologic analysis and to evaluate diagnosis methods: Ziehl-Neelsen staining, immunohistochemistry reaction, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Ligase Chain Reaction (LCR). Ten cases of parotid mycobacteriosis in advanced autopsied AIDS patients were selected. Methods for detection of genus *Mycobacterium* were conducted (Ziehl-Neelsen staining, BCG immunohistochemistry reaction and PCR for amplification of small region of gene responsible for conserved protein in the genus *Mycobacterium*). Methods for qualitative detection of "*M. tuberculosis* complex" (LCR and PCR) and *Mycobacterium avium* (PCR) were also conducted. The intraparotid lymph nodes were mainly involved (10 cases) and the glandular parenchyma was affected in only 3 cases. Two patterns of parotid mycobacteriosis were diagnosed: 8 cases showed a chronic non-caseating partly granulomatous inflammation and 2 cases displayed an infiltrate of foamy macrophages, full of mycobacteria, scant areas of necrosis and no granuloma formation. Evaluating the immunological profile of parotid mycobacteriosis, macrophages were more prevalent, followed by TCD8 lymphocytes, B lymphocytes and TCD4 lymphocytes. The three techniques performed for genus detection showed similar sensitivity and were positive for all cases (10 cases). "*M. tuberculosis* complex" was detected in 5 cases by LCR and in 8 cases by PCR. The *M. avium* infection was detected in 1 case only, which was also positive for "*M. tuberculosis* complex" showing a co-infection result. The PCR technique for "*M. tuberculosis* complex" detection showed better results than LCR. PCR was an efficient diagnosis method for identification of *Mycobacterium* species in paraffin-embedded parotid mycobacteriosis.

1. INTRODUÇÃO

Vinte e três anos depois da primeira evidência clínica da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em 1981, o mundo se depara com a doença mais devastadora da raça humana. Mais de 40 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo vírus, e cerca de 20 milhões já morreram de AIDS globalmente (UNAIDS 2003).

Como consequência da epidemia da AIDS, nos últimos anos tem sido notado um aumento marcante nos casos de outras doenças infecciosas, como por exemplo a tuberculose. A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é condição reconhecidamente associada a um maior risco no desenvolvimento de doenças provocadas por micobactérias, especialmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*. Cerca de metade dos indivíduos infectados pelo HIV desenvolvem infecções micobacterianas em alguma época da vida (Nightingale *et al.* 1992, Falkinham 1996), e possuem um risco aumentado para o desenvolvimento de Tuberculose ativa, por causa do alto risco de reativação de infecções latentes (Cruciani *et al.* 2001).

A tuberculose pode afetar localizações extrapulmonares e extranodais como as glândulas salivares, especialmente a parótida, apresentando-se clinicamente como uma massa sólida. Em um estudo realizado por Vargas *et al.* (2003) em parótidas de 100 pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada, o autor encontrou 10 casos de micobacteriose. Além dos métodos convencionais utilizados para o diagnóstico de micobacteriose, como a cultura microbiológica e a coloração de Ziehl-Neelsen, métodos moleculares têm sido desenvolvidos e extensivamente estudados, de modo que sua correta aplicação possa contribuir para um diagnóstico rápido e preciso.

Neste trabalho foram analisadas as características histológicas e imunohistoquímicas da micobacteriose parotídea de 10 pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada entre os anos de 1996 a 1999 na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Além disso, foram caracterizadas as espécies de *Mycobacterium* a partir de material parafinado,

identificando através da PCR e LCR o "complexo *M. tuberculosis*" e o *Mycobacterium avium* através da PCR.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Epidemiologia da AIDS

Vinte e três anos depois da primeira evidência clínica da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida em 1981, o mundo se depara com a doença mais devastadora da raça humana. Mais de 40 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo vírus, e cerca de 20 milhões já morreram de AIDS globalmente. Hoje, a AIDS é a principal causa de morte na África sub-saária, e neste continente é estimado que cerca de 26,6 milhões de pessoas estejam vivendo com HIV/AIDS, incluindo 3,2 milhões de pessoas que se tornaram infectadas durante o ano de 2003. A AIDS matou cerca de 2,3 milhões de pessoas em 2003 no continente africano. Dado marcante do último Boletim Epidemiológico da UNAIDS (2003) é que as mulheres entre 15-24 anos tem um risco 2,5 vezes maior em tornarem-se infectadas pelo HIV do que os homens. A epidemia nesse continente continua crescendo de forma descontrolada e hoje os esforços se concentram em estratégias de prevenção objetivando conter a transmissão do vírus.

A AIDS é hoje a quarta causa de morte no mundo e de acordo com o boletim epidemiológico da UNAIDS (2003), de um total de 40 milhões de pessoas infectadas, 37 milhões correspondem a adultos e 2,5 milhões a crianças menores de 15 anos. Cerca de 5 milhões de novas infecções foram adquiridas e cerca de 3 milhões de mortes foram registradas pela doença globalmente no ano de 2003.

A maioria das novas infecções têm ocorrido principalmente em adultos jovens e as mulheres estão sendo cada vez mais afetadas. Cerca de 1/3 das pessoas vivendo com HIV/AIDS encontram-se na faixa etária entre 15 e 24 anos e a maioria delas desconhece a soropositividade e os métodos de proteção que evitam a propagação do vírus (UNAIDS, 2003).

O número de casos de AIDS registrados no Brasil é de 257.780 pessoas de 1980 a dezembro de 2002 (Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da

Saúde). A partir de 1996, quando o governo brasileiro começou a distribuir gratuitamente as drogas antiretrovirais, o crescimento da epidemia se estabilizou em 20 mil novos casos por ano, até o ano de 1999. Em 2000, houve indício de declínio, com o registro de 15 mil novos casos, o qual foi confirmado no primeiro semestre de 2001. O Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (julho a setembro de 2001) trouxe modificações significativas da hierarquização das categorias de exposição dos casos de AIDS, no qual se observou redução da participação das categorias "homo/bissexual" - de 27,7% para 23,4% - ao mesmo tempo em que houve incremento das categorias de exposição "heterossexual" - de 27,4% para 32,3% - e "uso de drogas injetáveis" - que passou de 18,1% para 20,6% no total de casos notificados. Entre menores de 12 anos, a transmissão do HIV da mãe para o filho foi responsável por 90% dos casos notificados.

No ano de 2002, foram notificados 9.495 novos casos da epidemia e, desses, 6.031 ocorreram em homens e 3.464 em mulheres, mostrando o crescimento da epidemia entre as mulheres.

Outro dado preocupante é a crescente incidência da AIDS em relação à faixa etária de 13 a 19 anos em adolescentes do sexo feminino. Isto ocorre devido ao início precoce da atividade sexual feminina em relação aos adolescentes do sexo masculino, normalmente com homens com maior experiência sexual e conseqüentemente mais expostos aos riscos de contaminação por doenças sexualmente transmissíveis (DST) e pela AIDS.

Quanto às principais categorias de transmissão entre os homens, as relações sexuais respondem por 58% dos casos de AIDS, com maior prevalência nas relações heterossexuais (25%). Entre as mulheres, a transmissão do HIV ocorre, predominantemente, pela via sexual, correspondendo a 86,2% dos casos. As demais formas de transmissão, em ambos os sexos, de menor impacto na epidemia são: transfusão, transmissão materno-infantil ou ignoradas pelos pacientes (Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde, 2003).

2.2. HIV

A AIDS é causada pelo HIV, um retrovírus pertencente à família lentiviridae. Atualmente, sabe-se que existem dois tipos de vírus: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 está amplamente distribuído pelo planeta sendo o tipo viral mais comum, enquanto o HIV-2 está restrito à África Ocidental e em países com laços históricos e comerciais com esta região. Entretanto parecem ter a mesma origem filogenética, originando-se do SIV (vírus da imunodeficiência símia). A via de transmissão de ambos é a mesma, embora o HIV-2 tenha um risco de transmissão levemente menor e possa levar a uma progressão mais lenta para a AIDS (Harries & Maher 1996). As principais vias de transmissão do HIV são: sexual, parenteral e transmissão materno-infantil; embora o intercuro sexual seja a principal via em todo o mundo. O HIV é um vírus esférico com núcleo elétron denso rodeado por um capsídeo protéico, que é envolvido por um envelope lipídico derivado da célula infectada. O núcleo contém quatro proteínas, incluindo p24 e p17, duas fitas de RNA e uma enzima transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral em DNA, permitindo assim que o vírus possa integrar-se ao genoma da célula hospedeira. No envelope lipídico há duas glicoproteínas, gp120 e gp41, que são fundamentais para a infecção das células pelo vírus. A gp120 tem afinidade específica pela molécula CD4+, sendo esta molécula o alvo da infecção do HIV. As células do sistema imune que expressam esta molécula de superfície são os linfócitos T-helper, os monócitos, macrófagos e células dendríticas foliculares. O genoma proviral do HIV contém aproximadamente 10.000 pares de bases, com 2 LTR (long terminal repeats sequences) e 9 regiões, 3 delas codificadoras de proteínas (genes *gag*, *pol* e *env*) e outras 6 reguladoras (*tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif*). Os genes *gag*, *pol* e *env* são responsáveis pela codificação de proteínas estruturais: as proteínas virais p24, p17, gp120, gp41 e as enzimas transcriptase reversa, proteases e integrases (Kuritzkes, 1996). Além destes, o DNA proviral contém os genes reguladores, tais como *tat* e *rev* e genes acessórios, tais como o *nef*, *vpu*, *vpr* e *vif*. O produto do gene *tat* (transativador transcricional) é essencial

para a replicação do vírus, uma vez que aumenta de sete a 40 vezes a transcrição do gene viral. O gene *rev* é semelhante ao *tat*, visto que é essencial para a replicação do HIV, pois atua na fase pós-transcricional através da regulação do transporte de RNAm viral do núcleo para o citoplasma. O produto gênico do *nef* aumenta a infectividade do vírus e reduz a expressão de moléculas CD4 nas células infectadas. O produto do gene *vpu* aumenta a liberação do HIV na superfície das células infectadas e a degradação da molécula CD4 complexada tal como a proteína Env. O gene *vpr* produz uma proteína que permite ao HIV infectar células que não estão em divisão e bloquear a divisão celular. O produto gênico do *vif* é essencial para replicação do HIV em linfócitos no sangue periférico.

2.3. Patogenia da AIDS

A infecção pelo HIV caracteriza-se por uma severa imunossupressão, que afeta primariamente a imunidade celular. Isto resulta da infecção e perda acentuada de células TCD4+ e do comprometimento funcional das células T auxiliares sobreviventes. Há evidências científicas de que a molécula CD4 é um receptor de alta afinidade para o HIV.

Para que ocorra a infecção da célula, a molécula gp120 do HIV liga-se à molécula CD4 da superfície celular; embora ligue-se também à outras duas moléculas da superfície celular como a CCR5 (receptores das β -quimiocinas) e a CXCR4 (receptores de α -quiocinas). Após a ligação da gp120 à molécula CD4 e às demais moléculas de superfície participantes, a gp41 permite a fusão do vírus à membrana celular com subsequente entrada do genoma viral no citoplasma da célula. Uma vez internalizado, o genoma viral sofre transcrição reversa, levando à formação do DNA pró-viral. A partir daí o DNA pró-viral pode manter-se sob uma forma epissômica linear no citoplasma em casos de células quiescentes, ou adquirir uma forma circular e integrar-se ao genoma do hospedeiro, em células em divisão. Após essa integração o pró-vírus pode permanecer integrado no cromossomo por meses ou anos e assim, a infecção torna-se latente. Entretanto,

a qualquer momento, quando a célula for estimulada a dividir-se, o DNA pró-viral pode ser transcrito juntamente com o DNA da célula, levando a formação de novas partículas virais que brotam da superfície dela, levando-a a morte. Embora a redução acentuada das células TCD4⁺ possa ser responsável pela maior parte da imunodeficiência nos estágios avançados da infecção pelo HIV, há evidências de que se podem detectar defeitos qualitativos nas células T até mesmo em indivíduos assintomáticos (Cotran *et al.* 2000). Alterações na produção e regulação de citocinas por linfócitos Th (helper) CD4 tem um importante efeito nos eventos imunológicos associados à doença (Clerici & Shearer 1993; Graziosi *et al.* 1994; Maggi *et al.* 1994). As células Th são definidas pelas citocinas que sintetizam. Sendo assim, as células Th1 produzem interleucina 2 (IL-2) e interferon (IFN)- γ ; as células Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-10 (Mosmann *et al.* 1986; Yssel *et al.* 1992; Del prete *et al.* 1993), e as células Th0 produzem todas as citocinas citadas anteriormente (Rocken *et al.* 1992; Yssel *et al.* 1992; Del prete *et al.* 1993). Porém, uma associação precisa entre a distribuição dos grupos de células Th e a progressão da doença ainda não foram esclarecidas. Clerici & Shearer (1993) sugerem que a resistência, em contraste com a progressão para AIDS, é dependente do predomínio de respostas Th1 sobre Th2. Segundo Maggi *et al.* (1994) a infecção pelo HIV não induz uma mudança de Th1 para Th2, e ao invés disso favorece a expressão do fenótipo Th0. Além disso, estudos "*in vitro*" mostram que clones Th2, e principalmente Th0, suportam a replicação viral enquanto isto não é observado em clones Th1 testados. Assim, as diferentes citocinas produzidas por estes grupos de células Th, como também aquelas secretadas por outros tipos celulares, regulam diversos efeitos resultando na resposta imune do hospedeiro à infecção pelo HIV.

Por outro lado, tem sido demonstrado que uma aparente disfunção nas células Th de pacientes HIV⁺ assintomáticos pode ocorrer independentemente do número de células CD4 e do estágio clínico (Clerici *et al.* 1989; Clerici & Shearer 1993).

Portanto, os defeitos qualitativos que podem ser observados nas células T incluem: redução na proliferação de células T induzida por antígenos, diminuição das respostas do Th1 em relação ao tipo Th2 e defeitos da sinalização intracelular. O desequilíbrio entre respostas Th1 e Th2 favorece as respostas humorais sobre a imunidade celular. Há também uma perda seletiva do subgrupo de células T de memória. Além disso, podem haver anormalidades profundas na função das células B, incapacitando os pacientes a construir uma resposta de anticorpos contra um antígeno novo.

Em função dessas alterações, os pacientes apresentam linfopenia; redução da função das células T com perda de células de memória, susceptibilidade à infecções oportunistas, neoplasias, diminuição da hipersensibilidade do tipo tardio; alterações das células B e alteração nas funções de macrófagos e monócitos como redução da quimiotaxia, fagocitose e capacidade de apresentação de antígenos.

Desta forma o sistema imunológico vai sendo, lenta e progressivamente deteriorado gerando o desenvolvimento de uma série de doenças oportunistas, que culminará na morte do paciente (Cotran *et al.* 2000).

2.4. Tuberculose (TB)

A tuberculose é uma doença bacteriana causada por *Mycobacterium tuberculosis* e ocasionalmente por outras espécies como *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*. A transmissão ocorre pelo ar através de perdigotos, ou pelo espirro ou tosse de indivíduos com Tuberculose pulmonar. A transmissão normalmente ocorre em locais fechados, escuros e sem ventilação. O risco em tornar-se infectado depende do tempo de exposição e da susceptibilidade individual. A pessoa uma vez infectada permanece nesse estado por muitos anos e a grande maioria (90%) das pessoas HIV negativas infectadas pelo *M. tuberculosis* não desenvolvem a doença. Já as pessoas infectadas pelo HIV podem desenvolver a TB a qualquer momento.

Muitos são os fatores que podem levar ao desenvolvimento da doença, em especial situações de stress físico e emocional que acarretam alterações do sistema imunológico, e principalmente co-infecções, como pelo HIV. A doença pode então se desenvolver, podendo afetar outros órgãos além dos pulmões. Sem o devido tratamento, após 5 anos 50% dos pacientes com Tuberculose pulmonar morrem, 25% podem ser curados e 25% podem se manter no estado de portador crônico.

A infecção primária ocorre na primeira exposição ao bacilo. O bacilo escapa das defesas muco-ciliares dos brônquios, alojando-se nos alvéolos pulmonares terminais. A infecção inicia-se pela multiplicação dos bacilos no pulmão, correspondendo ao foco de Ghon. A drenagem linfática leva os bacilos aos linfonodos hilares. O conjunto, foco de Ghon e linfadenopatia hilar, corresponde ao complexo primário. Depois disso pode haver disseminação sanguínea para o corpo com acometimento de outros órgãos, o que é chamado de Tuberculose miliar. A resposta imune (hipersensibilidade tardia e imunidade celular) desenvolve-se cerca de 4 a 6 semanas após a infecção primária e o curso clínico da doença dependerá do estado imunológico do indivíduo. Como consequência da infecção primária, a infecção pode ou não evoluir, em função de uma reativação ou re-infecção, para complicações pulmonares, pleurais e para doença disseminada correspondendo à tuberculose extrapulmonar que afeta principalmente linfonodos, usualmente cervicais, sistema nervoso central, pericárdio, estômago e intestino (Harries & Maher 1996). De acordo com uma pesquisa de Crump & Reller (2003) a TB disseminada apresenta algumas condições predisponentes como: a infecção pelo HIV, terapia imunossupressora, alcoolismo, diabetes mellitus e desordens hematológicas.

2.5. Epidemiologia da Tuberculose

A diminuição progressiva da incidência de TB alcançou subitamente seu maior nível no início da década de 80. Como a curva de incidência dessa doença

aproximou-se de zero em muitas partes do mundo no final da década de 70, muitos microbiologistas tiveram a convicção de que a vitória contra a TB estava próxima. Na realidade, sucedeu o oposto. Atualmente as taxas de morbidade e mortalidade aumentaram, em função da emergência de cepas de diversas espécies de *Mycobacterium* resistentes a múltiplas drogas, acompanhando em particular, o surto da epidemia de AIDS. Estima-se que na atualidade 2 bilhões de pessoas estejam infectadas com *M. tuberculosis* e com outras espécies de *Mycobacterium*, e que 3 milhões de pessoas morram anualmente por complicações da doença em todo o mundo. Acredita-se que existam 8 milhões de novos casos a cada ano, 95% dos quais em países em desenvolvimento. Nos países industrializados, 80% dos casos são de pessoas maiores de 50 anos; enquanto nos países em desenvolvimento 80% dos envolvidos tem entre 15 e 50 anos. Calcula-se que 3 milhões de pessoas com TB no mundo também tenham AIDS. Existe uma estimativa de que 15 milhões de pessoas nos Estados Unidos tenham resultados positivos à prova cutânea ou apresentem doença clínica. As taxas são ainda maiores nos países em desenvolvimento, devido principalmente, ao aumento de imigração de pessoas provenientes de regiões de alta endemicidade, ao declínio das condições socioeconômicas nas cidades densamente povoadas e ao crescente número de indivíduos infectados com o HIV (Koneman *et al.* 2001).

2.6. Perfil imunológico da Tuberculose

A característica da infecção causada pelo *M. tuberculosis* é que a maioria dos adultos saudáveis, de 90 a 95%, controlam a infecção através da imunidade adquirida.

Apenas um pequeno número de bacilos que penetrem nos alvéolos distais dos pulmões são suficientes para instalar a infecção. Na maioria das pessoas a imunidade local inata, mediada primariamente por macrófagos alveolares, falha ao

controlar os bacilos de replicação lenta. Como consequência, o sistema imunológico é exposto a grandes quantidades de antígenos micobacterianos resultando no desenvolvimento de uma imunidade adaptativa. Na maioria dos adultos saudáveis, a imunidade adaptativa mediada por células T controla, mas não erradica a infecção (Boom *et al.* 2003). Entretanto a imunidade adaptativa protege contra a reinfecção e é particularmente importante em áreas de alta incidência de TB. A imunidade adaptativa ou protetora envolve vários tipos celulares, como macrófagos, células T CD4, e outros subtipos de células T, como células T CD8, células T gamadelta e células T CD1. Entretanto o papel central da imunidade contra o *M. tuberculosis* é mediada pelos macrófagos e células T CD4 e o real papel desses demais subtipos celulares ainda precisa ser elucidado. Os macrófagos são essenciais para o processamento e apresentação de antígenos às células T. Sabe-se que a diversa população de células T reconhece uma ampla gama de antígenos micobacterianos apresentados por diferentes moléculas apresentadoras de antígeno, o que contribui para a detecção do patógeno pelo hospedeiro. Para sobreviver nos macrófagos o *M. tuberculosis* desenvolve mecanismos para bloquear a resposta imune. Esses mecanismos incluem modulação dos fagossomos, neutralização de moléculas efetoras dos macrófagos, indução de secreção de citocinas inibitórias, interferência no processamento de antígenos às células T. Entretanto a importância desses mecanismos depende do estágio da infecção: infecção primária, persistência, reativação ou TB ativa. Por exemplo, a supressão de citocinas e apoptose parecem ser mais importantes durante as fases em que o bacilo encontra-se em alta taxa de replicação, especialmente durante a fase primária e de reativação. Por outro lado, a inibição do processamento de antígenos parece ser o mecanismo de defesa mais importante durante a fase persistente da infecção. A interação hospedeiro-patógeno é determinada pela interação das células T com os macrófagos infectados. O resultado dessa interação resulta no controle da infecção ou em doença ativa.

Resumindo, a história natural da infecção pelo *M. tuberculosis* caracteriza-se, após a fase inicial inata do sistema imunológico, no desenvolvimento de uma imunidade adaptativa aguda que tem por objetivo controlar a rápida divisão do bacilo. Segue-se então, a fase imune crônica ou de memória, necessária para controlar os bacilos persistentes e proteger contra possíveis reinfecções. A falha durante as fases de imunidade adaptativa aguda ou crônica resultam na TB, levando à disseminação do bacilo para outro hospedeiro (Boom *et al.* 2003).

2.7. Gênero *Mycobacterium*

As micobactérias estão posicionadas taxonomicamente na Ordem *Actinomycetales*, Família *Mycobacteriaceae* sendo portanto, o *Mycobacterium tuberculosis* e o *Mycobacterium avium*, espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (Brasil, Ministério da Saúde 1994; Holt *et al.* 1994; Murray *et al.* 1999). O gênero *Mycobacterium* é constituído por bacilos aeróbicos, imóveis, não esporulados, não encapsulados, medindo 1-10 micrômetros (μm) de comprimento por 0,2-0,6 μm de largura. Possuem alto conteúdo lipídico na sua parede celular tornando-a hidrofóbica e resistente a muitos desinfetantes e corantes utilizados em laboratório, apresentando assim propriedade morfotintorial álcool-ácido resistente. Portanto, mantém o corante após a lavagem com álcool e ácido, apresentando-se com coloração avermelhada. O tamanho de seu genoma é em torno de 4,4mb, com alto conteúdo de G-C (62-70%).

O gênero *Mycobacterium* é formado pelo "complexo *Mycobacterium tuberculosis*" e mais de 80 espécies de micobactérias não-tuberculosas, sendo algumas destas patogênicas para homens e animais, algumas oportunistas, outras não-patogênicas, além de algumas serem saprófitas (Soini & Musser 2001). As infecções humanas são causadas principalmente por espécies de crescimento lento como *Mycobacterium tuberculosis*, pelo "complexo *Mycobacterium avium*" (MAC) e *Mycobacterium kansasii* (Kim *et al.* 2001). Entretanto, a espécie mais importante do gênero é o *M. tuberculosis*, o agente causador da tuberculose. O

complexo *M. tuberculosis* é composto pelo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* e *M. microti*.

Algumas espécies são ditas não-tuberculosas, pois não são consideradas verdadeiros patógenos e raramente causam infecção, exceto em casos de severa imunodeficiência, com contagem de linfócitos T CD4 baixa, como na AIDS. Esses microrganismos apresentavam anteriormente a denominação de "micobactérias atípicas", entretanto são agora reconhecidas como "micobactérias não-tuberculosas". Entre essas espécies algumas são mais freqüentemente isoladas de pacientes com AIDS como: as pertencentes ao "complexo *M. avium*", *M. Kansasii*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. genavense*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae* e *M. xenopi*. De forma semelhante à infecção causada pelo MAC, essas espécies tendem a disseminar-se nesses pacientes. O *M. kansasii* (MK) causa infecção com quadro clínico e radiográfico semelhante ao causado pelo *M. tuberculosis*.

O complexo *Mycobacterium avium* é composto por no mínimo duas espécies: o *M. avium* e o *M. intracellulare* e são os principais agentes causadores de infecção entre as espécies não-tuberculosas. Há relatos de uma terceira espécie o *Mycobacterium scrofulaceum*, denominado "complexo MAIS" (Inderlied *et al.* 1993). Com base nas propriedades fenotípicas e genotípicas, foram propostas três subespécies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *silvaticum*, entretanto a subespécie *avium* é a única patogênica para o homem (Thorel *et al.* 1990). Estas são micobactérias de crescimento lento, não-cromogênicas e necessitam de mais de 7 dias de incubação para adquirir crescimento maduro a uma temperatura entre 35 e 37°C (Runyon 1965). Suas colônias apresentam-se pequenas, lisas e ligeiramente opacas.

A doença pulmonar em indivíduos imunocompetentes é causada, tanto pelo *M. avium*, quanto pelo *M. intracellulare* em iguais proporções, entretanto em pacientes portadores de AIDS, quase sempre a espécie envolvida é o *M. avium*,

numa percentagem entre 87 e 98% dos isolados e o *M. intracellulare* é mais frequente entre os HIV negativos (Inderlied *et al.* 1993; Devallois & Rastogi 1997).

As infecções causadas pelas diversas espécies podem levar a manifestações clínicas diferentes, as quais interferem na antibioticoterapia a ser empregada (French *et al.* 1997). A maior diferença entre TB e outras infecções micobacterianas é que o *M. tuberculosis* é transmitido de pessoa para pessoa. Em função disto, é importante que a TB seja diagnosticada o mais rápido possível a fim de evitar sua propagação.

2.8. Infecção provocada por microrganismos do “complexo *Mycobacterium avium*”

O MAC é um microrganismo encontrado no meio ambiente: no solo, água, alimentos e animais. Há relatos de isolamentos em poeira doméstica (Reis *et al.* 1984, Havlir & Ellner 2000). Embora o MAC seja um importante agente causador de doença em suínos e aves domésticas, o microrganismo excretado nas fezes desses animais persiste no solo por longos períodos, entretanto alguns estudos sorológicos e epidemiológicos não suportam a hipótese de que animais sejam um importante reservatório para as infecções humanas. Não há evidência suficiente da transmissão inter-humana dos microrganismos do MAC (Peters *et al.* 1995, Murray *et al.* 1998, Havlir & Ellner 2000). A identificação de microrganismos nos aerossóis de águas da costa do Atlântico similares aos isolados de pacientes com doença pulmonar sugere que a inalação desses aerossóis seja a origem da infecção (Parker *et al.* 1983). Assim é provável que a infecção seja adquirida pela inalação ou ingestão de alimentos ou água contaminada, explicando o fato do isolamento inicial em escarro e fezes, e posterior desenvolvimento de doença disseminada. As manifestações clínicas da doença disseminada não são observadas até que haja replicação e invasão maciça de bacilos nos órgãos, interferindo em suas funções. Horsburgh *et al.* (1994) mostraram que a ingestão de queijos “duros”, bem como a diminuição do número de linfócitos CD4+ no

sangue periférico são, isoladamente, fatores de risco para a aquisição de doença provocada por *M. avium*.

O fator de risco mais importante para a aquisição da doença em pacientes não infectados pelo HIV é a existência de pneumopatias crônicas como por exemplo, a bronquite crônica ou doenças pulmonares obstrutivas (Murray *et al.* 1998). Em crianças com linfadenite cervical devido ao MAC parece que a fonte de aquisição é o solo ou a água, e que esses microrganismos penetram pela gengiva, mucosa oral ou progridam ao sistema linfático através das amígdalas (Wolinsky 1995). A ingestão de microrganismos do ambiente seguido pela invasão do trato gastrointestinal tem sido sugerido como a principal via de infecção nos pacientes com AIDS, uma vez que os microrganismos são freqüentemente isolados das fezes desses pacientes (Damsker & Bottone 1985). Há também uma correlação positiva importante entre a presença de MAC em amostras respiratórias e subsequente desenvolvimento de doença disseminada (Jacobson *et al.* 1991). Indivíduos imunocompetentes podem ter colonização respiratória e intestinal assintomática, mas raramente desenvolvem doença disseminada (Inderlied *et al.* 1993). Nenhuma característica foi identificada para explicar porque, entre mais de 100 espécies de micobactérias "não-tuberculosas", o *M. avium* é a causa mais comum de infecção nos seres humanos (Oliveira *et al.* 2003).

Algumas intervenções são necessárias para a redução das doenças micobacterianas, como a melhoria das condições sócio-econômicas, tratamento adequado e rápido, quimioprofilaxia e vacinação por BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). A medicação inadequada tem levado a baixas taxas de cura e aumento de resistência às drogas empregadas. Em contrapartida, o tratamento rápido prolonga significativamente a sobrevida dos pacientes. Portanto, há necessidade de pesquisas para agilizar a realização do diagnóstico e conduzir ao tratamento adequado (Porter 1996, Opravil 1997).

2.9. AIDS e Tuberculose

Sabe-se que as infecções micobacterianas estão relacionadas com uma baixa contagem de células CD4+. Está bem estabelecido que as infecções oportunistas em pacientes HIV+ estão diretamente relacionadas a um agravamento da imunossupressão e também são bons indicadores da progressão da doença (Matee *et al.* 2000, Ohtomo *et al.* 2000).

Nos últimos anos tem sido notado um aumento marcante nos casos de tuberculose. O ressurgimento da tuberculose está amplamente relacionada com a epidemia da AIDS. Os pacientes infectados pelo HIV possuem um risco aumentado para o desenvolvimento de Tuberculose ativa por causa do alto risco de reativação de infecções latentes (Cruciani *et al.* 2001). Além disso, a tuberculose adquirida evolui rapidamente nesses indivíduos (Mayaud & Cadranel 1999). Um paciente HIV positivo tem um risco 10 vezes maior de desenvolver tuberculose (Harries & Maher, 1996). O risco de reativação de uma infecção micobacteriana latente é maior em pacientes HIV+ (9.7-10.4 casos em 100 pacientes) quando comparado aos pacientes HIV- (0.07-0.1 casos em 100 pacientes) (Rose *et al.* 1998).

Na recente epidemia de AIDS dos países africanos sub-Saáricos, o número de casos de TB dobrou ou triplicou num período de 10 anos. A associação TB/AIDS também tem sido observada em todo o mundo. Em Nova York, os pacientes com TB são mais frequentemente infectados pelo HIV do que a população em geral. Já na Ásia a TB tem aumentado devido a rápida disseminação do HIV e estima-se que aproximadamente 1,3 milhões de adultos estão co-infectados por ambos agentes infecciosos (Shafer & Edlin 1996). A epidemiologia de AIDS no Brasil mostra alta associação com a TB. Tendências anuais indicam um declínio estatisticamente significativo de todas as complicações oportunistas relacionadas a AIDS, como a candidose, tuberculose, pneumocistose, pneumonia, toxoplasmose cerebral, Sarcoma de Kaposi, meningite criptocócica e infecções protozoárias; entretanto tem sido notificado um aumento na incidência

de TB nas regiões Nordeste e Centro-Oeste. De 1980 a 1997, a candidose foi à infecção oportunista relacionada à AIDS mais prevalente no Estado de São Paulo (59,9%) enquanto a TB representou 32,5% das infecções oportunistas (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 1998).

Nos pacientes infectados pelo HIV, a TB pulmonar é a forma mais comum da doença, embora a TB extrapulmonar também seja freqüente e possa ocorrer em função da acentuada imunossupressão. As formas mais comuns de TB extrapulmonar em indivíduos HIV positivos é a efusão pleural, doença pericárdica e TB miliar (Harries & Maher 1996). No Boletim epidemiológico HIV/AIDS da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo (1998), a forma pulmonar da doença foi encontrada em 19,2% dos pacientes enquanto a forma disseminada, extrapulmonar ou não-cavitária em 13,3% dos casos. Indivíduos soropositivos apresentam um padrão atípico de TB com achados radiográficos incomuns e em muitos casos o diagnóstico é feito na necrópsia (Smith *et al.* 2000). Além disso a TB aumenta a susceptibilidade para outras doenças oportunistas, assim como aumenta as taxas de mortalidade. Considerando a alta comorbidade de TB/AIDS no mundo, especialmente no Brasil, Song *et al.* (2003) descreveram as características clínicas e epidemiológicas de 559 casos da comorbidade no período de 1989 a 1997 do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Encontraram que a transmissão heterossexual foi a principal forma de contágio (38,9%) do HIV, seguido pelo uso de drogas injetáveis (29,3%), contato homo/bissexual (23,2%), transfusão sanguínea (5%) e transmissão vertical (3,6%). Houve uma predominância para o gênero masculino. A relação homem/mulher foi de 3:1, entretanto com o decorrer do tempo houve uma diminuição dessa relação. A faixa etária mais envolvida foi a de 20 a 39 anos e a maioria dos indivíduos apresentavam baixa escolaridade. Observaram também altas taxas de TB extrapulmonar.

A pandemia da AIDS têm levado ao desenvolvimento de TB causada por outras espécies, ditas não-tuberculosas. Antes da pandemia, micobactérias não-tuberculosas raramente causavam doença, mesmo em indivíduos

imunocomprometidos. A profunda e prolongada supressão do sistema imune celular, observada na AIDS, favorece que microrganismos relativamente avirulentos possam causar doença. Portanto, desde que a AIDS foi reconhecida, novas doenças causadas por micobactérias, com manifestações clínicas diferentes, têm sido descritas. Desde então, novas espécies têm sido descobertas e os esforços têm se concentrado nas áreas de diagnóstico, tratamento e prevenção destas infecções (French *et al.* 1997).

Antes da epidemia da AIDS, o MAC foi considerado como responsável, na maioria dos casos, por infecções pulmonares que atacavam pacientes com pneumopatias prévias, como o enfisema pulmonar e a bronquite crônica. Em 1981 com o surgimento da AIDS, o MAC apresentou-se como um dos mais frequentes microrganismos causadores de doença nesses pacientes. O "complexo *Mycobacterium avium*" foi logo reconhecido como causa de infecção disseminada na AIDS e é hoje a causa mais comum de infecção bacteriana sistêmica, afetando de 15 a 40% dos pacientes com a doença. A incidência dessas infecções têm aumentado e esse fato se deve ao tempo prolongado de sobrevivência dos pacientes, e pelo uso indiscriminado de profilaxia para *Pneumocystis carinii* e da terapia antiretroviral.

A infecção causada pelo MAC nos pacientes imunocomprometidos, diferentemente dos imunocompetentes onde a infecção se restringe aos pulmões, caracteriza-se por bacteremia e posterior disseminação para fígado, medula óssea, linfonodos e baço (French *et al.* 1997).

Na Europa Central é mais freqüente a infecção por bactérias do MAC entre os indivíduos HIV+ do que por *M. tuberculosis* (Opravil 1997). Em estudo semelhante, outros autores discordam, argumentando que a incidência do MAC em países desenvolvidos está mais relacionada com as condições gerais de moradia. Nesse estudo, os autores associaram a doença disseminada pelo MAC a diversos fatores considerados de risco, como o uso de drogas injetáveis, condição sócio-econômica e quantidade de linfócitos T CD4+ periféricos. Um quarto dos pacientes analisados apresentou doença disseminada (Franzetti *et al.* 1997). Nos

poucos artigos disponíveis, realizados em países em desenvolvimento acerca dessas infecções, sugere-se que a incidência de infecção pelo MAC é menor nesses países e atribui-se esse fato à exposição mais freqüente e intensa ao *M. tuberculosis*, entretanto destaca-se que isso pode dever-se ao despreparo de alguns centros em identificar corretamente tais infecções. Em países desenvolvidos, a prevalência e as características dessas doenças na população infectada pelo HIV são bem descritas. Entretanto, dados similares provenientes de países em desenvolvimento, não são encontrados com frequência devido à ausência de tecnologia apropriada para o diagnóstico e a escassez de materiais para o cultivo e identificação dessas micobactérias.

A maior parte dos dados relativos à epidemiologia da infecção disseminada pelo MAC antecede a era da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART), quando as infecções provocadas por microrganismos oportunistas eram mais freqüentes. Segundo Chaisson *et al.* (1992) após a introdução da profilaxia para a pneumocistose e maior sobrevida proporcionada pela introdução da zidovudina (AZT), a incidência da infecção pelo MAC, em um grupo de 1006 pacientes com AIDS, foi de 19%. Uma variedade de taxas de incidência têm sido relatadas em diferentes estudos envolvendo esses indivíduos. Neles, o evento mais relacionado ao desenvolvimento de infecções pelo MAC foi a baixa quantidade de células T CD4 positivas no sangue periférico (Chaisson *et al.* 1998). Entretanto de acordo com Mayaud & Cadranel (1999), mesmo com a eficiente terapia antiretroviral (HAART) contra o HIV, a tuberculose continua sendo um grave problema nos pacientes HIV+.

As taxas de infecção pelo MAC em 566 indivíduos portadores de AIDS variaram entre 10,5 e 21,6% em algumas cidades americanas e de 2,4 a 2,6% em Trinidad e Quênia (von Reyn *et al.* 1996). No sudeste da Inglaterra, de 803 amostras de micobactérias isoladas de 727 pacientes infectados pelo HIV, 356 pertenciam ao "complexo *M. avium*" (Yates *et al.* 1993). Na Argentina, de 240 pacientes infectados pelo HIV com cultura positiva para micobactérias, 92,9% delas eram *M. tuberculosis* e 5,8% eram pertencentes ao MAC (Di Leonardo *et al.*

1995). Já no estudo de Molina Gamboa *et al.* (1996) no México foram isoladas 10 amostras de *M. tuberculosis* e 12 de MAC em 118 indivíduos HIV positivos.

2.10. Morfologia da glândula parótida

A parótida é uma glândula salivar composta por 100% de ácinos serosos. Nos cortes em parafina de espécimes bem conservados, as células aparecem repletas de grânulos secretores.

A parótida tem três tipos de ductos. Os ductos intercalares que são alongados e geralmente ramificados, os estriados e os excretores que freqüentemente mostram-se recortados na sua borda luminal, e algumas vezes contém material eosinofílico. O ducto excretor principal (ducto de Stensen) se abre na boca na altura do segundo molar superior.

Adipócitos são raros nas parótidas de crianças, mas aumentam durante a adolescência, podendo constituir mais de 25% do volume da glândula no adulto.

Durante o desenvolvimento embrionário, a parótida pode envolver linfonodos regionais, que permanecem dentro da glândula em expansão. A maioria das parótidas humanas contém no mínimo um linfonodo no seu interior, o qual apresenta todos os aspectos estruturais de um linfonodo típico, incluindo cápsula, seio subcapsular, córtex com nódulos e medula com trabéculas. Estes linfonodos são muitas vezes invadidos por elementos glandulares, principalmente ductos estriados, que se misturam com o tecido linfóide. Em alguns casos, linfonodos normais da região parotídea podem conter pequena quantidade de tecido parotídeo (Mjor & Fejerskov 1990).

2.11. Tuberculose nas glândulas salivares

Tuberculose na parótida e demais glândulas salivares é rara mesmo nos países onde a doença é comum e há cerca de 100 casos relatados na literatura (Janmeja *et al.* 2003).

Os pacientes não têm sintomas específicos de tuberculose, principalmente na ausência de história de tuberculose pulmonar, e a parótida apresenta-se como se tivesse uma neoplasia, sendo os pacientes submetidos freqüentemente a parotidectomia (Franzen *et al.* 1997, Bhat *et al.* 1996).

A tuberculose foi reportada nas glândulas salivares maiores (Van Der Walt & Leake 1987, Ammar-Khodja 1986) e menores (Milleron *et al.* 1982) de pacientes HIV negativos.

Cleary & Batsakis (1995) realizaram uma análise retrospectiva da doença micobacteriana em cabeça e pescoço. Revisando as localizações extranodais de ocorrência de infecção por *M. tuberculosis* em cabeça e pescoço, encontraram que entre as glândulas salivares maiores, a parótida é o sítio de maior envolvimento e a infecção normalmente se inicia nos linfonodos intraparotídeos e usualmente não se observa evidência de envolvimento pulmonar. Mullins *et al.* (2000), descreveram a parótida como principal local de TB entre as glândulas salivares maiores e propõem incluir a TB como diagnóstico diferencial, em casos nos quais se observe aumento de volume na região, em função do aumento do número de casos nos últimos anos.

Sánchez *et al.* (1993), relataram que a linfadenite tuberculosa, sobretudo a cervical era freqüente quando não se controlava a tuberculose bovina, sendo a bucofaringe sua porta de entrada, e tendo como conseqüência o acometimento de linfonodos cervicais, entretanto atualmente o quadro é bastante raro. Os autores relataram também que o envolvimento de glândulas salivares é muito raro e quando ocorre, a glândula submandibular é mais freqüentemente afetada. Para Stanley *et al.* (1983) a parótida é mais acometida em casos de TB isolada e a glândula submandibular é mais envolvida em casos onde há manifestações sistêmicas.

Tuberculose difusa na parótida com foco pulmonar primário foi relatado por Rowe-Jones *et al.* (1992). No estudo feito por Franzen *et al.* (1997) 17 de 20 pacientes HIV negativos com tuberculose mostraram uma massa sólida

correspondendo à infecção no linfonodo intraparotídeo e nos três casos restantes a tuberculose apresentou-se difusa no parênquima parotídeo.

Watanabe *et al.* (2001) relataram 2 casos de infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis* dentro de Tumores de Warthin. Ambos os casos apresentavam o Tumor de Warthin associado a áreas de granulomas epitelióides. A infecção foi confirmada por PCR e os autores sugerem que ambos os componentes apresentam um padrão similar de desenvolvimento em linfonodos regionais.

A infecção micobacteriana envolvendo o parênquima glandular e os linfonodos intraparotídeos ocorre, geralmente em decorrência de quadros de micobacteriose disseminada, provavelmente por disseminação linfática ou hematogênica (Vargas *et al.* 2003).

Jakob *et al.* (1995) relataram tuberculose nos linfonodos cervicais e no parênquima parotídeo de um paciente com AIDS, sem evidência de comprometimento pulmonar. O diagnóstico foi feito com Auramina-Rhodamina-Farbung, na qual através de fluorescência detectou-se um bacilo, com o resultado da coloração de Ziehl Nielsen negativo. Nesse trabalho, a parótida apresentou infiltrado inflamatório crônico discreto e granulomas epitelióides.

Singh *et al.* (1998) demonstraram a presença de tuberculose principalmente em linfonodos cervicais (89% dos 38 casos), além disso outras localizações foram afetados pela tuberculose nos pacientes HIV+ como por exemplo, pele, laringe e parótida, perfazendo 11% dos 38 casos. Segundo este autor, a tuberculose deve ser considerada no diagnóstico diferencial de lesões de cabeça e pescoço em pacientes HIV+, mesmo na ausência de tuberculose pulmonar.

Vargas *et al.* (2003) avaliando as alterações histopatológicas das parótidas de 100 pacientes autopsiados com AIDS, encontraram um grande número de lesões infecciosas (n=22), sendo que houve um predomínio de casos de micobacteriose (n=10).

O tratamento de escolha é a parotidectomia com preservação do nervo facial e terapia anti-tuberculose por 12 a 24 meses (Franzen *et al.* 1997, Bhat *et al.* 1996).

2.12. Métodos diagnósticos de tuberculose

2.12.1 Métodos diagnósticos convencionais

Embora o diagnóstico inicial da doença micobacteriana seja baseado em evidências clínicas, o diagnóstico definitivo envolve o isolamento e a identificação laboratorial do bacilo. Os pacientes que apresentam sinais suspeitos de tuberculose como, tosse com mais de três meses de duração, produção de escarro e perda de peso, são primeiramente pesquisados quanto à positividade para bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) em 3 amostras de escarro, através da coloração de Ziehl-Neelsen. Este é um teste rápido e barato, embora possua baixa sensibilidade, pois para a detecção do BAAR há a necessidade de 10.000 microrganismos por mililitro de escarro. Além disso, a forma de coleta do material e a forma de processamento podem diminuir a sensibilidade da técnica. Entretanto, mesmo após a repetição da pesquisa de BAAR, esses pacientes podem continuar apresentando resultados negativos, mas com evidência clínica de doença. O procedimento laboratorial usual, como já foi dito, consiste na descontaminação, digestão do espécime, pesquisa microscópica de BAAR (coloração de Ziehl-Neelsen), isolamento do microrganismo em cultura, identificação e teste de sensibilidade às drogas do agente infeccioso. O padrão ouro para o diagnóstico é a cultura micobacteriana. Entretanto, a velocidade de crescimento de algumas micobactérias, incluindo o *M. tuberculosis* é extremamente lenta e requer incubação por volta de 3 a 8 semanas em meio sólido, levando portanto, algumas semanas para a obtenção dos resultados, obrigando a equipe médica a instituir uma terapêutica anti-TB antes da identificação precisa da micobactéria, gerando falhas no diagnóstico e no

tratamento de TB (Harries & Maher 1996). A cultura apesar de sensível (detecta de 10 a 100 microrganismos por amostra), requer microrganismos viáveis podendo falhar em pacientes que já estejam sob tratamento anti-TB. Não mais que 85% dos casos de tuberculose confirmados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, são positivos para a cultura (Nagesh *et al.* 2001). Além disso, pode haver contaminação laboratorial gerando resultados falso-positivos. Por conseguinte, esses fatos resultam na necessidade da realização de outros exames, testes ou técnicas, mais sensíveis e rápidos que contribuam para o diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes, uma vez que a detecção da causa e o tratamento eficaz são a chave do sucesso no controle das doenças micobacterianas (Nagesh *et al.* 2001).

2.12.2 Métodos Diagnósticos Moleculares

Na última década (1990-2000) vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção direta, identificação e teste de susceptibilidade a drogas de micobactérias. Esses métodos podem reduzir potencialmente o tempo do diagnóstico de semanas a dias, embora requeiram equipamentos sofisticados e pessoal técnico altamente qualificado.

Há vários métodos de amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos de micobactérias, os quais estão disponíveis comercialmente desde 1997 e estão divididos em 3 categorias principais: 1) sistemas de amplificação da sequência alvo, 2) sistemas de amplificação por sondas ou primers (sequências sintéticas de oligonucleotídeos sense e antisense) e 3) sistemas de amplificação de sinais. Na primeira categoria podem ser citadas as técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), TMA ("transcription-mediated amplification"), SDA ("strand displacement amplification"), NASBA ("nucleic acid sequence-based amplification"). Na segunda categoria, o LCR (Reação em cadeia da ligase) e o Q-Beta ("Q-Beta replicase amplification"). Na terceira o bDNA ("branched DNA signal amplification").

O objetivo comum de todas essas técnicas é reduzir o tempo necessário para detecção do patógeno em espécimes clínicos, aumentar a sensibilidade e especificidade e simplificar o teste pela automação. Cada método possui suas vantagens, entretanto o impacto de cada método individualmente ainda não está determinado (Roth *et al.* 1997).

O FDA americano (The Food and Drug Administration) aprovou no final da década de 90 dois testes comerciais para amplificação de ácidos nucleicos para a detecção direta do *M. tuberculosis* nos espécimes, sendo eles: o Enhanced *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (E-MTB; Gen-Probe, San Diego, CA) e Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor; Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ). A identificação através da sequência rRNA 16S tem sido bastante utilizada e levou ao desenvolvimento de testes rápidos (kits) sendo comercialmente produzidos pela Gen-Probe Inc. (San Diego, California, U.S.A.), mostrando alta sensibilidade (cerca de 95%) na identificação do complexo *M. tuberculosis*, do MAC, *M. gordonae* e *M.kansasii* (Frothingham & Wilson 1993).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Desde a primeira aplicação no diagnóstico da tuberculose em 1989 por Brisson-Noel, a PCR tem sido a técnica mais amplamente usada para amplificação de ácidos nucleicos de micobactérias. A PCR permite amplificar especificamente pequenos fragmentos de DNA em termociclador, com ciclos de diferentes temperaturas, cuja sequência alvo esteja presente em uma quantidade de apenas 1 picograma. Utilizam-se primers que se hibridizam com a sequência alvo complementar, a enzima DNA polimerase que faz a extensão da fita de DNA, em conjunto com oligonucleotídeos individuais que formam a nova fita de DNA; além de cofatores ou substratos para a reação. A cada ciclo a quantidade de DNA é dobrada, possibilitando a amplificação do segmento em questão. Atualmente a técnica da PCR está bem desenvolvida e vem sendo extensivamente utilizada para o diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas (Nagesh *et al.* 2001).

A PCR permite variações da técnica, como por exemplo a PCR-Nested, na qual se usam pequenos primers que se enquadram dentro de uma sequência previamente amplificada, permitindo uma reamplificação de ácidos nucleicos a partir do produto do primeiro ciclo do PCR. Esta técnica de PCR é bastante específica e muito sensível, embora seja passível de contaminação (Roth *et al.* 1997).

Sabe-se que a realização de técnicas de biologia molecular, como a PCR, em material fixado em formol e embocado em parafina apresenta limitações e resultados variados, pois devido ao processamento do tecido podem ocorrer alterações físicas e químicas no DNA, afetando a sensibilidade e especificidade da PCR. Em casos de micobacteriose, a realização dessas técnicas em material embocado em parafina é particularmente importante em casos onde houve falha na cultura microbiológica ou também em casos sem evidência clínica de doença onde não foram coletados materiais para cultura. (Marchetti *et al.* 1998, Salian *et al.* 1998). Preparações de solução de formol tamponado ou não-tamponado podem inibir a eficiência da PCR e diminuir a sensibilidade do ensaio (Greer *et al.* 1991, Fiallo *et al.* 1992, Ohara *et al.* 1992, Impraium *et al.* 1987). Um ensaio de PCR feito em tecido pulmonar de rato embebido em parafina, experimentalmente infectado por uma cepa padrão de *M. tuberculosis* detectou cerca de 9 microrganismos em um corte de tecido com 5µm de espessura (Rish *et al.* 1996). Fixação em solução de formol tamponado neutro por mais de sete dias parece ter efeito insignificante na sensibilidade do ensaio (Salian *et al.* 1998).

Marchetti *et al.* (1998) compararam a sensibilidade e especificidade de 4 ensaios de PCR nested para detecção de *M. tuberculosis* em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina. O primeiro ensaio amplificou uma região do segmento mtp40 específico para o *M. tuberculosis*; o segundo amplificou uma pequena região do gene que codifica um antígeno de 65-kDa e que é altamente conservado dentro das espécies de micobactérias; o terceiro e quarto ensaios amplificaram a mesma sequência de inserção, a IS6110 que está usualmente representada em múltiplas cópias dentro do genoma do "complexo *M.*

tuberculosis", entretanto com primers diferentes. Os autores encontraram melhores resultados de sensibilidade e especificidade para os dois últimos ensaios, entretanto os resultados foram mais satisfatórios para o quarto ensaio, no qual os produtos amplificados eram menores. Com esses resultados os autores concluíram que a IS6110 parece ser um bom alvo para amplificação de DNA em tecidos fixados em formol e emblocados em parafina.

Salian *et al.* (1998) compararam a PCR com o diagnóstico clínico, à coloração de Ziehl-Neelsen e à cultura micobacteriana em 60 amostras emblocadas em parafina suspeitas de tuberculose. Quando comparado aos dados clínicos, a PCR foi positiva para 14 dos 19 casos com evidência clínica de TB, negativa para todos os casos suspeitos de infecções micobacterianas não-tuberculosas (sensibilidade de 73,6% e especificidade de 100%). Quando comparado à positividade para cultura de *M. tuberculosis*, a sensibilidade foi de 100% e a especificidade de 93%. Os autores concluíram que a PCR é útil na detecção de *M. tuberculosis* em tecidos fixados em formol e pode ser útil para aumentar a acurácia do diagnóstico.

Da mesma forma, Vago *et al.* (1998) a partir da realização da PCR Nested para identificação do *M. tuberculosis* com fragmento interno amplificado de 123pb em material parafinado, propuseram ser esse um método simples e de alta sensibilidade para o diagnóstico de *M. tuberculosis* em material parafinado.

Hsiao *et al.* (2003) realizaram reações de PCR em amostras emblocadas em parafina, que possuíam áreas de inflamação granulomatosa sem evidência de bacilos álcool-ácidos resistentes. De 34 casos estudados, 22 foram positivos para a detecção de *Mycobacterium* spp. pela PCR e desses, 18 (56,2%) foram positivos para a seqüência de inserção IS6110. Os quatro casos restantes foram considerados como micobacteriose atípica. Com isso demonstraram que a PCR permite uma detecção sensível e rápida em lesões paucibacilares de pele fixadas em formol e emblocadas em parafina.

Eguchi *et al.* (2003) realizaram a detecção de *M. tuberculosis* por Nested PCR em saliva, placa dental, dentes extraídos, lesões cariosas e placa bacteriana

de dentaduras, coletadas de pacientes com TB. A taxa de detecção por PCR em amostras de saliva, placa dental, lesões cariosas e dentaduras foi de 98%, 92%, 89% e 100% respectivamente. Enquanto a taxa de detecção por cultura foi de 17,3%, 2%, 0% e 0%, concluindo que a PCR é essencial para a detecção de *M. tuberculosis* em amostras orais.

Sequências de Inserção (ISs)

Sequências de inserção são sequências repetitivas invertidas localizadas nas extremidades de elementos de transposição ou "transposons", que são segmentos de DNA que podem se transferir de uma região para outra do genoma. As sequências de inserção normalmente possuem entre 750 e 2500 pares de bases. Elas são flanqueadas por repetições invertidas de 10 a 40pb. Uma IS simples contém uma enzima transposase, flanqueada por repetições invertidas curtas (IRs). As IRs formam um bloco de seqüências similares orientadas em direções opostas e são elas que são reconhecidas pela transposase nas etapas iniciais da transposição (Liebert *et al.* 1999). As sequências de inserção (ISs) são espécie-específicas e podem ser utilizadas para identificá-las (Leão *et al.* 1999). Muitos elementos de inserção têm sido utilizados para identificação de diferentes espécies de *Mycobacterium*.

Para a identificação do "complexo *M. tuberculosis*", a sequência de inserção IS6110 é muito utilizada, ocorre de 1 a 20 cópias por célula e é considerada um alvo ideal para a amplificação (Roth *et al.* 1997).

Já para a identificação do "complexo *M. avium*" onze elementos de inserção têm sido empregados na identificação do MAC: IS900 no *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, IS901 e IS1110 no *M. avium*, IS1141 no *M. intracellulare* e posteriormente IS1245 que está presente em múltiplas cópias no genoma de cepas de *M. avium* isoladas de materiais clínicos (Guerrero *et al.* 1995, van Soolingen *et al.* 1998).

Recentemente Sangari *et al.* (2000) descreveram a IS666 como sendo restrita ao *M.avium*, presente em 21% de seus isolados variando entre 1 a 7 cópias, ao contrário da IS1245 que apresenta uma média aproximada de 20 cópias, oferecendo um alto poder discriminatório.

A IS1245 é específica para o *M. avium*, contém 1313pb e codifica uma transposase, tendo sido descrita por Guerrero *et al.* (1995). Existe uma alta homologia dessa sequência com a IS1085, encontrada em *M. bovis*. Ambas pertencem à família de sequências relacionadas ao elemento IS256, descoberto em *Staphylococcus aureus* (Guerrero *et al.* 1995, McAdam *et al.* 2000). Treze sequências de inserção micobacterianas (IS1081, IS6120, IS1245, IS1311, IS1395, IS1407, IS1408, IS1511, IS1512, IS2606, IS1553, IS1554 e IS1552) foram identificadas como membros desta família (McAdam *et al.* 2000). Estudos prévios têm demonstrado que a IS1245 é realmente uma sequência estável nas espécies de *M. avium* (Picardeau & Vincent 1996, Pestel-Caron & Arbeit 1998).

Muitos são os trabalhos utilizando a IS1245 como marcador molecular para identificação do *M. avium*, parecendo ser esta, pelo menos até o presente momento, a mais utilizada e com resultados satisfatórios na identificação do *M.avium*. Ferreira *et al.* (2002) encontraram positividade de 94% para a IS1245 em amostras positivas para micobactérias não-tuberculosas.

Ohtomo *et al.* (2000) avaliaram os casos de micobacteriose presentes em pacientes autopsiados com AIDS no Japão enfatizando as infecções causadas pelo MAC. A infecção foi confirmada por PCR em 17 de 43 casos (40%). Já a imunohistoquímica para o anticorpo anti-BCG (anticorpo policlonal) e coloração de Ziehl-Neelsen mostraram a mesma sensibilidade (7 casos – 16%), concluindo que a PCR foi mais eficaz no diagnóstico que a reação imunohistoquímica e coloração de Ziehl-Neelsen.

Reação em Cadeia da Ligase (LCR)

A Reação em Cadeia da Ligase (LCR) é uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos bastante pesquisada que utiliza quatro sondas de oligonucleotídeos, enzima DNA-ligase termoestável, enzima DNA-polimerase termoestável e nucleotídeos individuais. As sondas hibridizam duas a duas, uma após a outra, em uma sequência complementar específica dentro do DNA cromossômico a ser pesquisado, permanecendo um espaço de alguns nucleotídeos entre as sondas. A DNA-polimerase termoestável preenche esses espaços, utilizando os nucleotídeos individuais. Em seguida a DNA-ligase termoestável atua unindo covalentemente as duas sondas, formando um produto complementar à sequência alvo. A sequência gênica a ser detectada pelo LCR codifica uma proteína antigênica b, que é específica para o "complexo *M. tuberculosis*" (Ljungqvist *et al.* 1990). A amplificação ocorre quando todos esses elementos são colocados no termociclador. A temperatura elevada no início de cada ciclo separa as duas fitas de DNA, assim como o produto de amplificação ligado a sequência alvo. A diminuição posterior da temperatura, na presença de novas sondas, permite a hibridização dessas aos alvos disponíveis e formação de novos produtos de amplificação da sequência alvo. Esses ciclos continuam até que se atinja um número suficiente de produtos de amplificação passível de ser detectado. De acordo com o manual do fabricante (Abbott LCx Probe System, Abbott Laboratórios do Brasil) após 30-40 ciclos a sequência alvo poderá ter um bilhão de cópias.

A técnica de LCR para amplificação de ácidos nucleicos, acima descrita, foi patenteada na Europa por Keith Backman em 1987 e utilizada pelos laboratórios Abbott (Abbott Park, IL, EUA, 60064), no início da década passada, para amplificação e posterior detecção de DNA de *Neisseria gonorrhoeae*, mostrando sensibilidade de 100% e especificidade de 97,8% (Birkenmeyer & Armstrong 1992). Em seguida esse mesmo laboratório utilizou o método para pesquisa do

Vírus da Imunodeficiência Humana e para *Chlamydia trachomatis* (Laffler *et al.* 1993).

Os primeiros trabalhos com a utilização da técnica de LCR para amplificação de DNA do complexo *M. tuberculosis* foram publicados em 1997. Nesse curto período várias séries foram relatadas comparando os resultados dessa técnica com a pesquisa direta de BAAR e cultura para micobactérias, que são os métodos convencionais para diagnosticar TB em material a fresco.

Ausina *et al.* (1997) e Lindbräthen *et al.* (1997) utilizaram como padrão ouro a cultura e dados clínicos, mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre a técnica de LCR e a cultura de micobactérias.

Tortoli *et al.* (1997), Rohner *et al.* (1998) e Viinanen *et al.* (2000) utilizaram a técnica de LCR tendo a cultura e os dados clínicos evolutivos, associados ao emprego de terapêutica específica, como padrão ouro. Mostraram então uma sensibilidade discretamente menor da cultura em relação à técnica de LCR. Enfatizaram que a menor sensibilidade verificada com a cultura poderia ser decorrente do tratamento específico. A manutenção de positividade nos pacientes tratados tornaria, a técnica de LCR de pouca utilidade para monitoramento do tratamento.

Lindbräthen *et al.* (1997), Jouvesshomme *et al.* (1998) e Lumb *et al.* (1999) ao separarem as amostras para pesquisa do "complexo *M. tuberculosis*" através da técnica de LCR em dois grupos, com pesquisa para BAAR positiva e negativa, mostraram maior sensibilidade para o grupo com pesquisa positiva.

Garrino *et al.* (1999) estudaram também separadamente amostras de pacientes com pesquisas para BAAR positivas e negativas e observaram que o aumento da sensibilidade nas amostras negativas foi baixo, desencorajando nessas características o uso da LCR.

Tortoli *et al.* (1997), Ruiz-Serrano *et al.* (1998) e Viveiros *et al.* (1999) compararam a técnica de LCR para amostras pulmonares e não-pulmonares, e obtiveram maior sensibilidade para as amostras pulmonares.

Outros autores compararam diferentes técnicas de amplificação de DNA para o complexo *M. tuberculosis*, incluindo a técnica de LCR.

Piersimoni *et al.* (1998) obtiveram em material respiratório valores de sensibilidade e especificidade de 75,7% e 98,8% para o LCx-Abbott® e de 92,8% e 99,4% quando usaram a técnica do MTB-Gen-probe® (PCR). Em material não-respiratório, os mesmos autores, relataram valores menores de sensibilidade e especificidade, de 53,6% e 99,3% e de 78,6% e 99,3% para as duas técnicas, respectivamente. Nessa avaliação a sensibilidade do MTB-Gen-probe® foi significativamente melhor, e ambas mostraram-se bastante específicas.

Tortoli *et al.* (1999) mostraram valores de sensibilidade e especificidade de 88,46% e 99,78% para o LCx-Abbott® e de 77,69% e 99,78% para o Amplicor PCR-Roche® em material respiratório, e em material não-respiratório, de 64,71% e 97,92% para LCx-Abbott® e 58,82% e 100% para o Amplicor PCR-Roche®. A sensibilidade do LCx-Abbott® foi discretamente melhor.

Apenas um estudo testou o método em material extraído de parafina, utilizando-se 74 biópsias de pleura, sendo 57 com diagnóstico de tuberculose e 17 controles, que foram testados com dois métodos comerciais de amplificação, MTB-Gen-probe® e LCx-Abbott®. A sensibilidade de 52,6% para MTB-Gen-probe® e 63,2% para LCx-Abbott® foi em ambos menor que a observada em material a fresco, e a especificidade foi de 100% (Ruiz-Manzano *et al.* 2000).

Conseqüentemente em função dos resultados contraditórios e muitas vezes não satisfatórios, o grande número de artigos publicados avaliando a LCR se concentrou entre os anos de 1997 e 2000. Atualmente nota-se uma tendência para a padronização de uma nova técnica, especialmente a PCR para identificação de infecções micobacterianas.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Analisar os aspectos histológicos de 10 casos de micobacteriose parotídea provenientes de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada.
2. Avaliar o padrão da resposta inflamatória nas áreas de micobacteriose parotídea através de reações imunohistoquímicas;
3. Realizar uma comparação de sensibilidade entre técnicas utilizadas atualmente no diagnóstico de micobacteriose (Coloração de Ziehl-Neelsen, Imunohistoquímica para BCG, Reação em Cadeia da Ligase - LCR - e Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em material parafinado.
4. Caracterizar as espécies de *Mycobacterium* através de 2 métodos moleculares: PCR e LCR. Identificar o “complexo *M. tuberculosis*” através da PCR e LCR, e a espécie *M. avium* por PCR.

5 PACIENTES E MÉTODOS

4.1. Pacientes

Neste trabalho foram estudadas amostras de glândulas parótidas com micobacteriose obtidas de 10 pacientes autpsiados com AIDS em fase avançada, no período de 1996 a 1999, no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SVOC-FMUSP), mediante autorização do Departamento de Patologia da FMUSP e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP. Os casos foram selecionados por critério histológico, de trabalho previamente realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (VARGAS *et al.* 2003).

Os 10 casos estudados neste trabalho foram numerados em algarismos arábicos de 1 a 10. Portanto, a mesma numeração foi respeitada para todas as técnicas realizadas (histoquímicas, imunohistoquímicas e moleculares).

4.2. Dados obtidos dos prontuários hospitalares

Os dados clínicos referentes aos pacientes incluídos neste estudo foram obtidos a partir da análise das informações presentes nos prontuários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, quanto à idade, gênero, causa *mortis*, nível de linfócitos T CD4/CD8, uso de terapia antiretroviral contra o HIV, profilaxia ou tratamento para TB e dados referentes à cultura micobacteriana nesses pacientes.

4.3. Colorações histoquímicas

Todos os casos foram revisados mediante obtenção de cortes histológicos de 5µm de espessura, que foram corados pelas técnicas de Hematoxilina & Eosina e Ziehl-Neelsen para detecção de bacilos álcool-ácidos-resistentes.

4.4. Reações imunohistoquímicas

Foram realizadas reações imunohistoquímicas a fim de se avaliar o padrão da resposta inflamatória bem como a positividade para o bacilo.

As reações foram efetuadas no laboratório de Patologia da FOP/UNICAMP e seguiram o seguinte protocolo. Inicialmente foram obtidos cortes parafinados de 3µm de espessura que foram montados em lâminas silanizadas. Em seguida foi realizada a 1ª desparafinização (a quente) em xilol a 60°C por 30 minutos, 2ª desparafinização (a frio) em xilol a temperatura ambiente por 20 minutos. Seguiu-se a hidratação dos cortes em etanol absoluto, etanol a 90%, etanol a 70%, etanol a 50% e lavagens em água corrente e destilada. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, em água oxigenada (10 volumes) em 5 banhos de 5 minutos cada. Já a recuperação antigênica foi realizada pela fervura em forno de microondas, com solução de ácido cítrico 10mM/pH 6,0, em dois ciclos de 12 minutos cada, em potência máxima (750W), foi deixado esfriar até atingir a temperatura ambiente, seguido por lavagens em água corrente/destilada e solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS). Posteriormente realizou-se a incubação com o anticorpo primário, diluído em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS, em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Foram realizadas 3 lavagens em solução de PBS.

Para cada anticorpo foi utilizada a seguinte diluição: anti-BCG (*Micobacterium bovis*, Dako®, código PO124, 1:10000); CD8 (Dako®, clone MxH, 1:200); CD20 (Dako®, clone L26(1,2), 1:10000); CD4 (CD45RO, Dako®, clone OPD4, 1:200); CD68 (Dako®, clone PG-M1, 1:400); CD45 (Antígeno Leucocitário Comum – LCA, Dako®, CD45 clone PD7/26/16E2B11, 1:2000). As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Strept ABC Complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, Dako) por 30 minutos a 37°C na diluição de 1:500, seguido por 3 lavagens em tampão PBS. Foram então, incubadas com o complexo Streptavidina – Biotina (Dako) por mais 30 minutos, e reveladas com substrato cromogênico (3,3 diaminobenzidina - DAB

(Sigma), 120mg por 100ml de PBS mais 2 ml de água oxigenada 10 volumes) por 3 a 5 minutos (a 37°C em câmara escura), seguido por lavagens em água corrente e destilada. As lâminas foram então contra-coradas com Hematoxilina de Carazzi por 3 minutos e lavadas em água corrente e destilada. Os cortes foram desidratados em 2 banhos de álcool absoluto, seguido pela diafanização em xilol por 10 minutos, mais 10 minutos em novo xilol e montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá.

4.5. Análise histomorfométrica

As lâminas submetidas às reações imunohistoquímicas para determinação do padrão da resposta inflamatória foram analisadas em sistema de imagem (System KS-400 versão 2.1, Carl Zeiss, Alemanha).

A imunoreatividade do componente inflamatório para os anticorpos CD8, CD4, CD20, CD68 e CD45 foi quantificada através de contagens de células positivas em 10 campos de $21.208,57\mu\text{m}^2$ em áreas periféricas às áreas de necrose. A mesma região de cada caso foi analisada para todos os anticorpos. A imunopositividade para o bacilo foi avaliada mediante observação direta em microscópio óptico (Carl Zeiss, Alemanha).

4.6. Métodos moleculares

4.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em todos os casos de micobacteriose parotídea. Após a obtenção dos cortes para realização das colorações histoquímicas e imunohistoquímicas, foram obtidos 10 cortes de $5\mu\text{m}$ em fita única de cada bloco de parafina, e foram depositados em tubos de polipropileno estéreis de 1,5ml (Eppendorf).

Tomou-se o cuidado de trocar a navalha e desinfetar com álcool 70% as pinças utilizadas depois do corte de cada bloco, a fim de se evitar contaminação.

Inicialmente as amostras foram desparafinizadas adicionando-se 1ml de xilol ao tubo. Em seguida o tubo foi agitado no vortex por 2-5 segundos e foi deixado descansar por mais 5 minutos. A seguir foi centrifugado a 14000rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente, em uma centrífuga anti-aerossol (Eppendorf). O sobrenadante foi então removido com uma micropipeta de 200µl (Rainin) com ponteiros esterilizados e a operação repetida.

Em seguida adicionou-se 1,0ml de etanol absoluto (Merck) e agitou-se no vortex por 2-5 segundos. O tubo foi novamente centrifugado nas mesmas condições citadas acima. O sobrenadante foi removido com uma pipeta de 200µl (Rainin) com ponteiros esterilizados e a operação repetida. Adicionou-se 1ml de álcool 70% a agitou-se no vortex por 2-5 segundos, seguido de centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi desprezado e o excesso foi removido com pipeta. Foi novamente realizada uma breve centrifugação (Spin) e foi cuidadosamente removido o restante de álcool. O tubo foi mantido aberto por mais 10 minutos a fim de uma completa evaporação do álcool. Após esse período e na ausência de odor alcoólico, foi acrescentado 450µl de Tampão Tris-EDTA pH 8.0, 50µl Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10% e 15µl de proteinase K a 20mg/ml (Gibco BRL). Os tubos foram então mantidos por um período de 16 horas em banho-maria entre 50 e 55°C.

Após esse período o conteúdo deveria estar totalmente líquido e não viscoso e iniciou-se a extração de DNA propriamente dita através da utilização de 2 solventes orgânicos: Fenol e Clorofórmio. Adicionou-se volume aproximado da soma dos três reagentes adicionados anteriormente Tampão Tris-EDTA + SDS + Proteinase K, portanto 500µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamínico (25:24:1, Gibco BRL). Agitou-se no vortex por 2 minutos, a amostra descansou por mais 5 minutos e em seguida foi feita a centrifugação a 9000 rpm por 15 minutos em uma centrífuga anti-aerossol. Após a centrifugação observamos a formação de 3 fases dentro do tubo, sendo a de maior densidade (fundo do tubo) correspondente ao

fenol, seguida pela fase intermediária ou orgânica (restos celulares digeridos) e esta pela fase aquosa que corresponde ao DNA extraído. A fase aquosa foi então transferida para outro tubo de polipropileno de 1,5ml (Eppendorf) estéril com auxílio de uma pipeta de 200µl e ponteiros esterilizados, tomando-se o cuidado de não tocar na fase intermediária ou orgânica, sendo o restante desprezado. Procedeu-se da mesma forma repetindo-se a etapa anterior. Após a transferência, novamente, da fase aquosa para outro tubo, adicionou-se 500µl de clorofórmio (Merck), o tubo foi agitado no vortex por 2-5 segundos, deixado descansar por 5 minutos e então centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro tubo onde iniciou-se a precipitação de DNA mediante a adição de 0,02 volume de Cloreto de Sódio 5M e 2,5 volume de etanol absoluto (Merck). O tubo foi deixado precipitando overnight a -20°C.

Após esse período foi realizada uma centrifugação a 10000rpm a 0°C por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o excesso cuidadosamente removido com pipeta. Adicionou-se 1ml de etanol a 75% gelado e foi realizada novamente a centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o tubo foi mantido aberto por 10 minutos para completa evaporação do álcool. Por fim, foi adicionado 50µl de Tampão Tris-EDTA pH 8.0 e o tubo foi mantido sob vigorosa agitação por 3 horas. Em seguida foi realizada a quantificação através da espectrofotometria (Spectronic Genesys 2) em 260nm e 280nm, obtendo-se portanto a concentração e o grau de pureza do DNA pela relação 260nm/280nm.

4.6.2 Controles positivos

Para as reações de PCR foram utilizados controles positivos e negativos em cada reação.

Para a amplificação da *IS6110*, presente no genoma do complexo *M. tuberculosis* foi utilizado o DNA extraído da cepa padrão MT14323, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos do Departamento de

Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/UNICAMP).

Para a amplificação da IS1245, presente no genoma do *M. avium* e suas subespécies, foram utilizados 2 controles internos: DNA extraído de cepa padrão IWGMT49 e DNA extraído de linfonodos mesentéricos de suínos infectados por *M. avium*, emblocados em parafina. O DNA extraído da cepa padrão IWGMT49 também foi gentilmente cedido pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/UNICAMP). Já o bloco de parafina foi gentilmente cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Suínos e Aves).

Como controles negativos foram utilizados DNAs extraídos de 3 diferentes tecidos emblocados em parafina: um fragmento de Fígado, um Carcinoma espinocelular bucal e uma Lesão de células gigantes.

4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas no laboratório de biologia molecular da área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Foram utilizados três conjuntos de primers, sendo o primeiro para detecção do gênero *Mycobacterium* através de PCR Nested (Ensaio PCR 1), o segundo para detecção do "complexo *M. tuberculosis*" também através de PCR Nested (Ensaio PCR 2) e o terceiro para detecção da espécie *M. avium* através de PCR simples (Ensaio PCR 3). O primeiro conjunto de primers possibilita a amplificação de pequena região de gene responsável pela codificação de proteína antigênica de 65kDa (Proteína de choque térmico) conservada entre as espécies de *Mycobacterium*. Os primers externos amplificam um fragmento de 234-bp sendo a sequência do primer sense : AGGCGTTGGTTCGCGAGGG e antisense: TGATGACGCCCTCGTTGCC. Os primers internos amplificam um fragmento de 142-bp sendo a sequência do primer sense: CCAACCCGCTCGGTCTCAA e antisense: CCGATGGACTGGTCACCC.'

O segundo conjunto de primers possibilita a amplificação de segmento da sequência de inserção IS6110 que permite a identificação do "complexo *M. tuberculosis*". Os primers externos amplificam um fragmento de 220-bp sendo a sequência do primer sense : CGGGACCACCCGCGGCAAAGCCCGCAGGAC e antisense: CATCGTGGAAGCGACCCGCCAGCCCAGGAT. Os primers internos amplificam um fragmento de 123-bp sendo a sequência do primer sense: CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG e antisense CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG.

As PCRs realizadas com os dois conjuntos de primers citados anteriormente foram baseadas nos protocolos descritos por Marchetti *et al.* (1998). Entretanto, o terceiro conjunto de primers usado para detecção da espécie *M. avium*, foi delineado por nós no laboratório de Biologia Molecular da Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), usando o programa "Amplify 1.2" (Universidade de Wiscosin, Madison, E.U.A.). Os primers sintetizados amplificam um segmento de 106pb da IS1245, específica para a espécie *M. avium*. A IS1245 foi obtida a partir do "Gene Bank" (NCBI - "National Center for Biotechnology Information" - NIH, E.U.A.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do número de acesso L33879. A sequência do primer sense é: TGGACCAGTCTGCCTT e antisense CGTCGATCAAGGCTTGGTAG. Os primers foram checados quanto à sua especificidade, comparando-os com todas as seqüências já identificadas presentes no "Gene Bank" (NCBI - "National Center for Biotechnology Information" - NIH, E.U.A.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Os DNAs extraídos dos 10 casos foram inicialmente checados quanto a sua integridade através da amplificação de pequena região de gene da β actina. Foram realizadas reações de PCR de 50 μ l contendo 5 μ l de 10X PCR Buffer, 3 μ l de 50mM Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1 μ l de 10mM dntp Mix, 1 μ l de cada primer (sense e antisense) diluídos na concentração de 10 μ M e 0,5 μ l de Taq DNA polimerase 5U/ μ l (Invitrogen, Life technologies, Brasil). A quantidade de DNA utilizada foi de 3 μ g para os Ensaios de PCR 2 e 3, e para o ensaio de PCR 1 utilizou-se 5 μ g de DNA. A quantidade de DNA utilizada para os controles positivos

de cepas padrão foi de 10ng e para os controles positivos e negativos de material parafinado foi de 2 µg. Água Milli-Q autoclavada foi adicionada para completar o volume final de 50µl. Este protocolo foi realizado no 1º ciclo das reações de Nested PCR, e no único ciclo da amplificação para a IS1245. Já para o 2º ciclo das reações de Nested PCR, foram montadas reações de 50µl contendo 5µl de 10X PCR Buffer, 3µl de 50mM Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1µl de 10mM dntp Mix, 1 µl de cada primer interno (sense e antisense) diluídos na concentração de 10µM e 0,5µl de Taq DNA polimerase 5U/µl (Invitrogen, Life technologies, Brasil). Foram adicionados 15 µl do produto do primeiro ciclo e água Milli-Q autoclavada para completar o volume final de 50µl. As condições do primeiro ciclo de PCR para amplificação da HSP65 foram: 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Para o segundo ciclo de PCR: 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. As condições do primeiro ciclo de PCR para amplificação da IS6110 foram: 94°C por 4 minutos, 20 ciclos de 94°C por 1,3 minutos, 63°C por 1,3 minutos, 72°C por 1,3 minutos e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Para o segundo ciclo: 94°C por 4 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1,3 minutos, 63°C por 1,3 minutos, 72°C por 1,3 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. As condições de PCR para amplificação da IS1245 foram: 94°C por 5 minutos, 45 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 4 minutos.

Oito microlitros de cada produto de PCR foram separados eletroforéticamente em géis de agarose a 1,8% e corados por Brometo de Etídio. Para documentação das reações de PCR, 10µl de cada produto de PCR foram separados eletroforéticamente em géis de poliacrilamida não desnaturantes a 8% e impregnados pela prata de acordo com Sanguinetti *et al.* (1994).

4.6.4 Técnica da Reação em Cadeia da Ligase (LCR) para pesquisa do "complexo *M. tuberculosis*"

Foi utilizada a técnica de amplificação da reação em cadeia da ligase (Ensaio LCx® *Mycobacterium tuberculosis*, Abbott, USA), para a detecção qualitativa de DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e diagnóstico de tuberculose. A técnica foi realizada no laboratório de biologia molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A técnica foi realizada nos 10 casos de micobacteriose parotídea. Foram obtidos 10 cortes de 5µm em fita única de cada bloco que foram depositados em tubos de polipropileno estéreis de 1,5ml.

Inicialmente, as amostras foram desparafinizadas adicionando-se 1,0ml de xilol ao tubo e agitando-se no vortex por 2-5 segundos. A seguir foram centrifugadas a 14000rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido com uma pipeta de transferência plástica descartável e a operação repetida.

Adicionou-se então 1,0ml de etanol absoluto e agitou-se no vortex por 2-5 segundos. A seguir, foram novamente centrifugadas a 14000rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido com uma pipeta de transferência plástica descartável e a operação novamente repetida. Foi acrescentado 0,35ml de água milli Q às amostras desparafinizadas, que foram novamente agitadas no vortex por 2-5 segundos.

A partir desse ponto o método foi executado em três etapas segundo as especificações do fabricante.

- Preparação das amostras:

O primeiro passo foi a eliminação dos potenciais inibidores das amostras através de centrifugação e lavagens. Colocou-se 0,5ml dessas amostras homogeneizadas nos *Tubos de Amostra* fornecidos pelo Ensaio LCx®. Os tubos foram agitados no vortex por 2-5 segundos. O material foi então centrifugado a

4000rpm durante 9 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram retirados cuidadosamente da centrífuga e o sobrenadante foi removido com uma pipeta de transferência plástica descartável. Adicionou-se 1,0ml do *Tampão de Ressuspensão de Amostras* fornecido pelo Ensaio LCx® e a operação foi repetida. Adicionou-se 0,5ml do mesmo tampão aos tubos de amostra e agitou-se no vortex durante 2-5 segundos.

O segundo passo foi a inativação pelo calor. Os tubos de amostra foram colocados no *Banho Seco Coberto*, que acompanha o Ensaio LCx®, à 95°C por 20 minutos. Após esse tempo as amostras foram retiradas do aparelho e permaneceram à temperatura ambiente por 10 minutos.

O terceiro passo foi a lise mecânica da parede bacteriana com liberação do material genético, tornando-o acessível aos componentes da reação. Os tubos de amostra foram colocados no *Aparelho de Lise*, acompanha o Ensaio LCx®, pelo tempo estabelecido pelo aparelho que era de aproximadamente 10 minutos. Após 5 minutos de descanso os tubos puderam ser retirados do aparelho e foram centrifugados a 13000rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente.

- Amplificação:

Foram colocados 0,1ml de cada amostra preparada nos *Frascos de Amplificação* também fornecidos pelo Ensaio LCx®, utilizando-se um pipetador com pontas com dispositivo anti-aerossol. Os frascos foram então imediatamente colocados no *Termociclador*, que acompanha o Ensaio LCx®, pelo tempo estabelecido pelo aparelho de aproximadamente 90 minutos. Após serem retirados do termociclador, manteve-se o produto à temperatura entre 15 e 30°C até a próxima etapa.

Os frascos de amplificação contém a mistura de reação composta por quatro sondas de oligonucleotídeos, DNA-ligase e DNA-polimerase termoestáveis e nucleotídeos individuais em tampão. A amplificação tem início quando a mistura de reação e a amostra são colocadas no termociclador. Aberta a fita de DNA da micobactéria, as quatro sondas de oligonucleotídeos ordenadas aos pares

hibridizam-se com a sequência alvo, deixando uma falha de alguns nucleotídeos entre as sondas (Figura 1, A e B). A polimerase preenche essa falha com os nucleotídeos da mistura de reação (Figura 1, C). A ligase une covalentemente as duas sondas formando um produto de amplificação, que atua como alvo para novas amplificações (Figura 1, D).

O programa consiste em 37 ciclos de três etapas, 1 segundo à 94°C, 1 segundo à 64°C e 40 segundos à 69°C. Durante o ciclo térmico, a temperatura elevada abre as fitas duplas. A diminuição da temperatura permite a hibridização de novas sondas de oligonucleotídeos para os alvos disponíveis. Os ciclos continuam até que se tenha atingido um número suficiente de produtos de amplificação passível de ser detectado. Os 37 ciclos térmicos previstos determinam uma amplificação de 1:1000000000 no número de sequências alvo, que são suficientes para detecção.

Utilizou-se um controle negativo e um calibrador fornecidos pelo Ensaio LCx®, em duplicata para o grupo de reações.

- Detecção:

Os tubos de amplificação foram retirados do termociclador e centrifugados a 13000rpm durante 10 segundos à temperatura ambiente, em centrífuga anti-aerossol. Posteriormente as amostras, os controles negativos e os calibradores foram colocados nas *Células de Reação do Carrossel do Analisador LCx*, que acompanha o Ensaio. Adicionou-se o *Reagente de Detecção* fornecido pelo Ensaio e ligou-se o aparelho. A detecção durou aproximadamente 60 minutos.

A detecção é feita através de um ensaio imuno-enzimático de micropartículas (MEIA). Os dois pares de sondas de oligonucleotídeos são identificados com grupamentos químicos imunorreativos, denominados haptenos. Cada sonda possui um hapteno de captura ou um hapteno de detecção, e o produto de amplificação proveniente da ligação de duas sondas terá um hapteno diferente em cada extremidade. Dentro do analisador as amostras amplificadas são automaticamente transferidas para uma cavidade de incubação, onde

micropartículas revestidas de anticorpos anti-hapteno de captura ligam-se aos produtos de amplificação e às sondas livres que possuem o hapteno de captura (Figura 1, E). Essa mistura é transferida automaticamente para uma matriz de fibra de vidro, onde as micropartículas ligam-se irreversivelmente. Uma lavagem elimina as sondas livres que possuem o hapteno de detecção. A mistura é então incubada com o anticorpo anti-hapteno de detecção conjugado à fosfatase alcalina, que se liga aos haptenos de detecção dos produtos de amplificação. Esse conjugado é detectado pela adição do substrato 4-metilumbeliferil-fosfato (MUP), que é desfosforilado pela fosfatase alcalina produzindo uma molécula fluorescente, a 4-metilumbiliferona, que é medida pelo sistema óptico (Figura 1, F).

Os resultados fornecidos pelo aparelho de detecção são valores numéricos considerados positivos ou negativos, quando comparados com valor de corte oferecido a cada reação. Valores acima de 1 são considerados detectáveis (positivos) e abaixo de 1 não-detectáveis (negativos). Os controles negativos e o calibrador que acompanham o Ensaio LCx® são utilizados para calcular o valor de corte do aparelho em cada reação. O valor de corte é obtido pela multiplicação da média dos controles positivos por 0,3. O resultado de cada amostra analisada é obtido pela divisão do valor de cada amostra (Rate) pelo valor de corte.

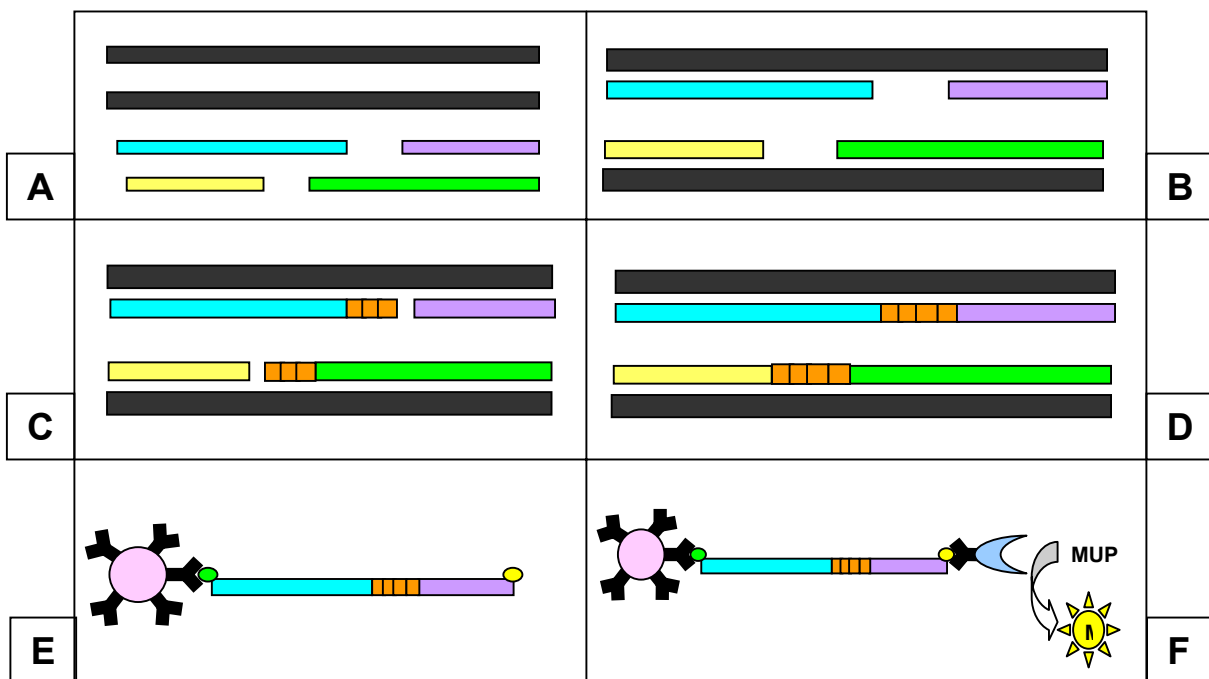


Figura 1 – Princípios da técnica da Reação em Cadeia da Ligase (LCR). A) fitas de DNA (preto) e as quatro sondas de oligonucleotídeos (coloridas). B) as quatro sondas de oligonucleotídeos ordenadas aos pares hibridizam-se com a sequência alvo, deixando uma falha de alguns nucleotídeos entre elas. C) a enzima DNA polimerase preenche a falha adicionando nucleotídeos, entretanto sem unir as sondas. D) a Enzima Ligase une covalentemente as duas sondas formando um produto de amplificação que servirá como molde para as novas amplificações. E) produto de amplificação proveniente da ligação de duas sondas contendo um hapteno de captura (verde) e um hapteno de detecção (amarelo). Nota-se a ligação de um anticorpo ao hapteno de captura. F) Ligação do anticorpo anti-hapteno de detecção (azul) conjugado a fosfatase alcalina que desfosforila o substrato adicionado (MUP) produzindo uma molécula fluorescente.

5. RESULTADOS

5.1. Dados clínicos e epidemiológicos

Todos os pacientes apresentaram como descritores de autópsia a presença de micobacteriose de padrão disseminado. A idade dos pacientes variou de 22 a 69 anos, com média de 40,4 anos $\pm$ 14,79. Oito pacientes pertenceram ao gênero masculino (80%) e 2 ao gênero feminino (20%), com uma proporção homem/mulher de 4:1. A média de idade das mulheres foi de 25,5 anos $\pm$ 4,94 e dos homens 44,12 anos $\pm$ 14,9.

Em função dos dados clínicos terem sido extraídos de prontuários clínicos, muitas informações relevantes não foram encontradas nos prontuários de todos os pacientes. Entretanto as informações presentes encontram-se descritas a seguir.

Em quatro casos foram encontradas informações quanto à contagem de células TCD4+ e relação CD4/CD8. O caso 3 apresentou valor de células TCD4 igual a 134 céls/ μ l; o caso 5 igual a 8 céls/ μ l, o caso 6 igual a 50 céls/ μ l e o caso 10 igual a 11 céls/ μ l. A relação CD4/CD8 foi obtida nos casos 3, 6 e 10; e foi respectivamente 0,48, 0,37 e 0,02 céls/ μ l. A partir desses resultados nota-se que em todos os casos disponíveis, o valor de células TCD4 esteve abaixo de 200 céls/ μ l, o que indica acentuada imunodeficiência.

O exame de cultura micobacteriana foi realizado em todos os casos excetuando-se o caso 9. Foram realizadas culturas em diferentes tipos de material e não foram observados resultados positivos, exceto no caso 7, no qual foram encontradas micobactérias em aspirado traqueal.

Três pacientes, referentes aos casos 3, 4 e 8 foram tratados pelo esquema tríplice para TB (Rifampicina, Pirazinamida, Isoniazida). Os pacientes referentes aos casos 1, 2 e 9 não receberam tratamento ou profilaxia para TB. Já nos casos 5, 6, 7 e 10 esta informação não foi encontrada.

5.2. Avaliação histopatológica

A partir da análise das lâminas coradas por Hematoxilina & Eosina observou-se que os linfonodos intraparotídeos foram afetados em todos os casos, enquanto o parênquima glandular em apenas 3 casos. Observou-se 2 padrões histopatológicos distintos: o padrão de granulomas mal formados e o padrão macrofágico difuso. Dos 10 casos, 8 (caso 3 ao caso 10) mostraram inflamação granulomatosa crônica com extensa necrose caseosa, sem a presença de células gigantes multinucleadas e com grande quantidade de micobactérias visualizadas pela coloração de Ziehl-Neelsen apenas em linfonodos intraparotídeos. Entretanto no caso 8, além do acometimento dos linfonodos observou-se área granulomatosa em parênquima glandular. Os outros 2 casos (casos 1 e 2) mostraram o padrão macrofágico difuso, onde foi observado um infiltrado de macrófagos espumosos, cheios de micobactérias, áreas de necrose caseosa sem evidência da formação de granulomas.

Nos casos 1 e 2, tanto os linfonodos como o parênquima glandular foram afetados e foi observada invasão maciça de macrófagos repletos de bacilos álcool-ácidos-resistentes, visualizados mediante observação de lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen. Estas células estavam permeadas por infiltrado inflamatório crônico, predominantemente linfocitário (Figuras 2, 3 e 4). Observou-se também extensas e difusas áreas de necrose caseosa com células em cariorréxis. Não foram observados granulomas bem formados de TB, com a presença de células gigantes do tipo Langhans, tampouco células epitelióides. Este conjunto de características histológicas sugere um quadro de micobacteriose atípica. Em ambos os casos, encontrou-se no parênquima glandular áreas de micobacteriose com macrófagos repletos de BAAR permeados por infiltrado inflamatório crônico (Figura 3). Simultaneamente observou-se no caso 2 a presença de Histoplasmose no interior dos linfonodos intraparotídeos, caracterizando uma co-infecção por *Histoplasma capsulatum* e *Mycobacterium* spp.

5.3. Reações imunohistoquímicas

A reação imunohistoquímica com o anticorpo primário anti-BCG (*Micobacterium bovis*, clone PO124 Dako®) permitiu fazer a identificação de *Mycobacterium* spp. nos cortes analisados. Os 10 casos foram imunopositivos para o anticorpo Anti-BCG (Figura 5).

O padrão imunológico da micobacteriose parotídea caracterizou-se por um maior número de células positivas para o anticorpo CD45, sendo de um modo geral, as células linfomononucleares predominantes. Entretanto, avaliando-se os tipos celulares individualmente, observou-se em ordem decrescente uma maior incidência de macrófagos, seguidos por linfócitos TCD8, linfócitos B e linfócitos TCD4. Não foi observada uma distribuição organizada de células ao redor dos granulomas.

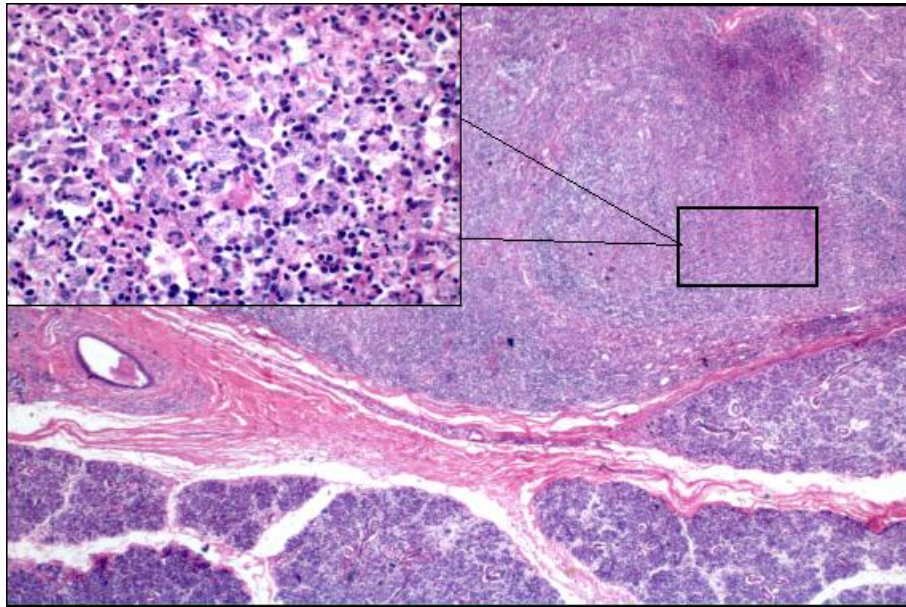


Figura 2 - Padrão macrófágico difuso da micobacteriose em linfonodo intraparotídeo do caso 1 (H&E, 100x). Em destaque notam-se abundantes macrófagos espumosos permeados por linfócitos (H&E,400x).

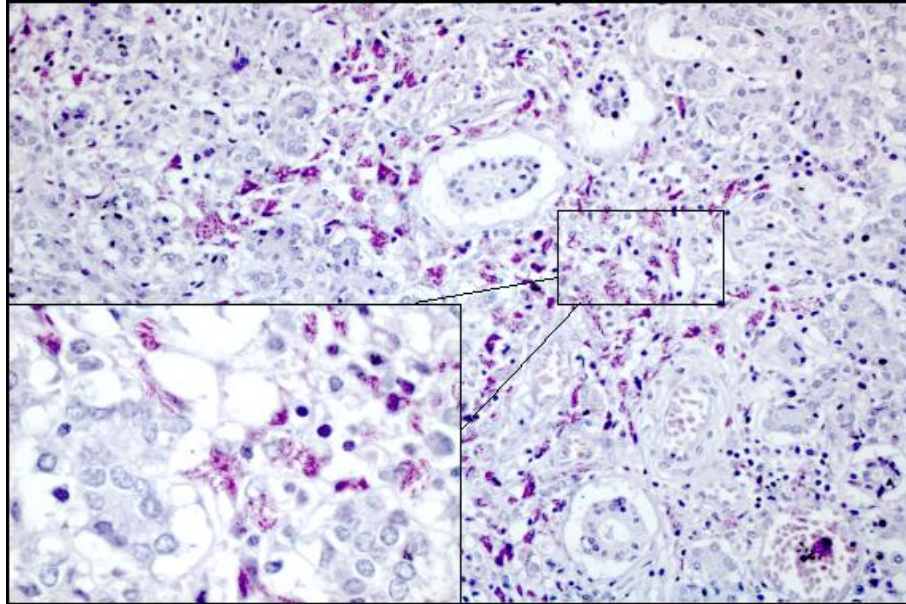


Figura 3 - Micobacteriose no parênquima glandular do caso 2 (Ziehl-Neelsen, 200x). Em destaque notam-se ácinos permeados por macrófagos repletos de BAAR (Ziehl-Neelsen, 1000x).

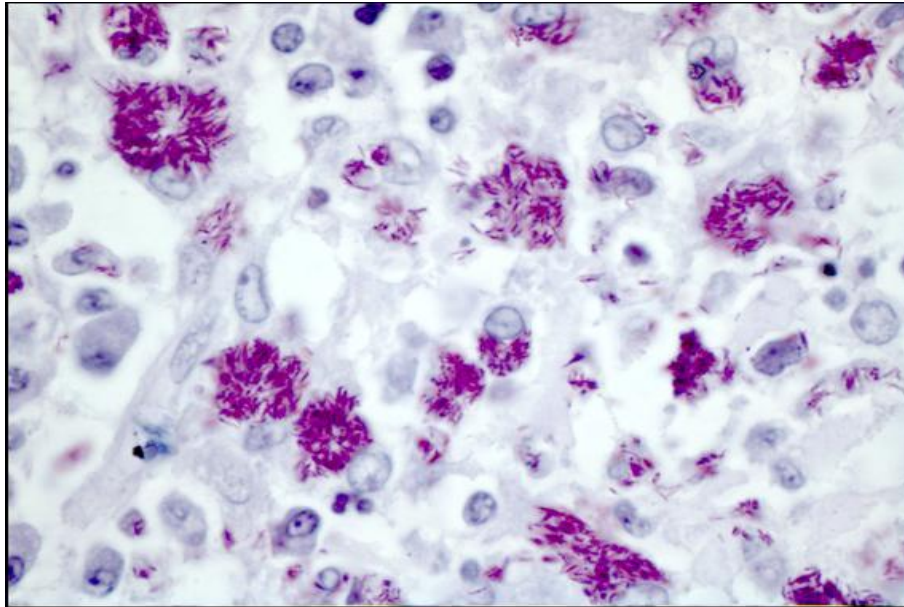


Figura 4- Caso 1. Macrófagos repletos de bacilos álcool-ácidos-resistentes em linfonodo intraparotídeo (Coloração de Ziehl-Neelsen, 1000x).

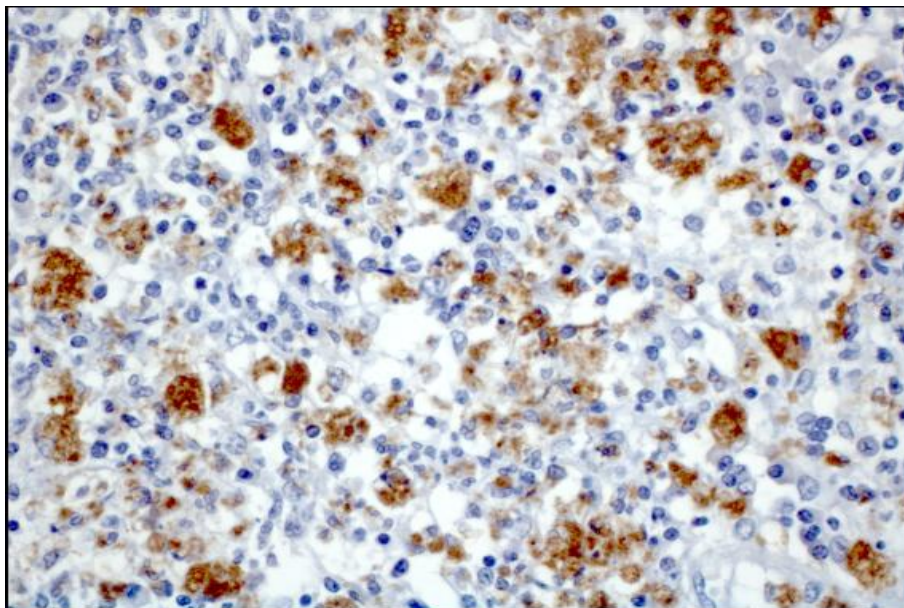


Figura 5- Linfonodo intraparotídeo. Macrófagos com inúmeros bacilos em seu interior (Imunohistoquímica para BCG, 400x).

Observou-se que as áreas ao redor dos granulomas estavam intensamente infiltradas por uma mistura de células inflamatórias (Figura 9). A marcação para o anticorpo CD45 foi difusa e a mais intensa em todos os casos com média de contagem de 79,02 células. Além disso, observou-se que as áreas de marcação para o anticorpo CD20 eram focais, sendo que a média foi de 17,4 células. Para os demais anticorpos analisados observou-se uma marcação escassa de células, sendo que as médias da contagem de todos os casos para os anticorpos CD68, CD8, e CD4 foram respectivamente, 34,34; 29,05 e 15,82 células, conforme a Figura 6. As reações para CD68 mostraram marcação ocasional, entretanto nos casos 1 e 2 a marcação foi mais intensa em função do padrão histopatológico macrófago difuso. Por esta razão, avaliou-se o padrão imunológico dos dois padrões histopatológicos da micobacteriose parotídea separadamente: o padrão de granulomas mal formados (GM) e o padrão macrófago difuso (MD). Ambos os padrões histopatológicos apresentaram um predomínio de células linfomononucleares, com média de 71,6 células positivas para o anticorpo CD45 no padrão GM e 97,6 células no padrão MD. A célula mais freqüente no padrão GM foi o linfócito T CD8, enquanto no padrão MD foram os macrófagos. As células menos freqüentes no padrão GM foram, em ordem decrescente, os macrófagos, linfócitos B e linfócitos T CD4 (Figura 7). Por outro lado, as células menos freqüentes no padrão MD foram, em ordem decrescente, os linfócitos TCD8, linfócitos TCD4 e linfócitos B, (Figura 8).

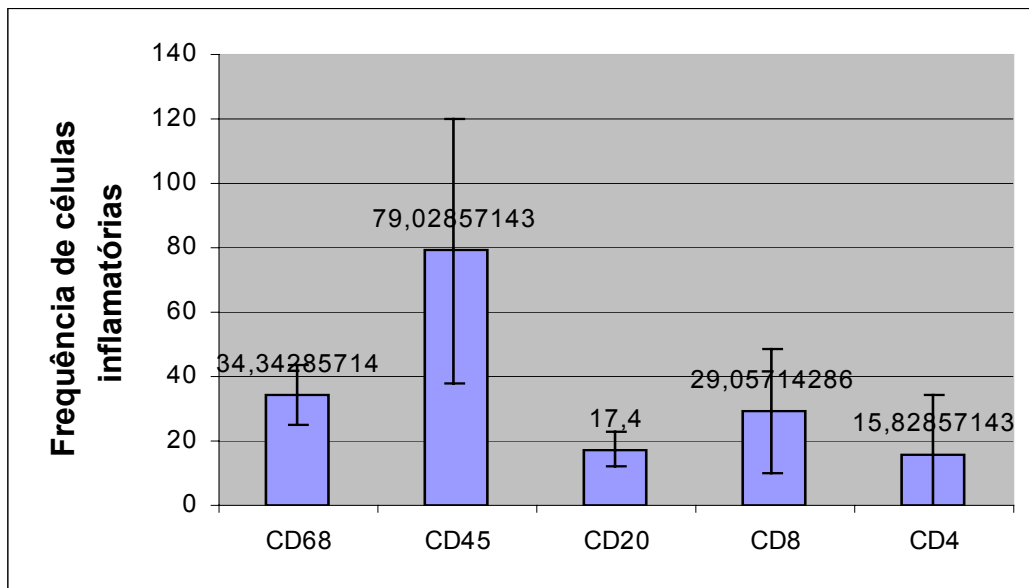


Figura 6 - Comparação entre médias da contagem de células imunopositivas para os anticorpos CD68, CD45, CD20, CD8 e CD4 nos 10 casos analisados.

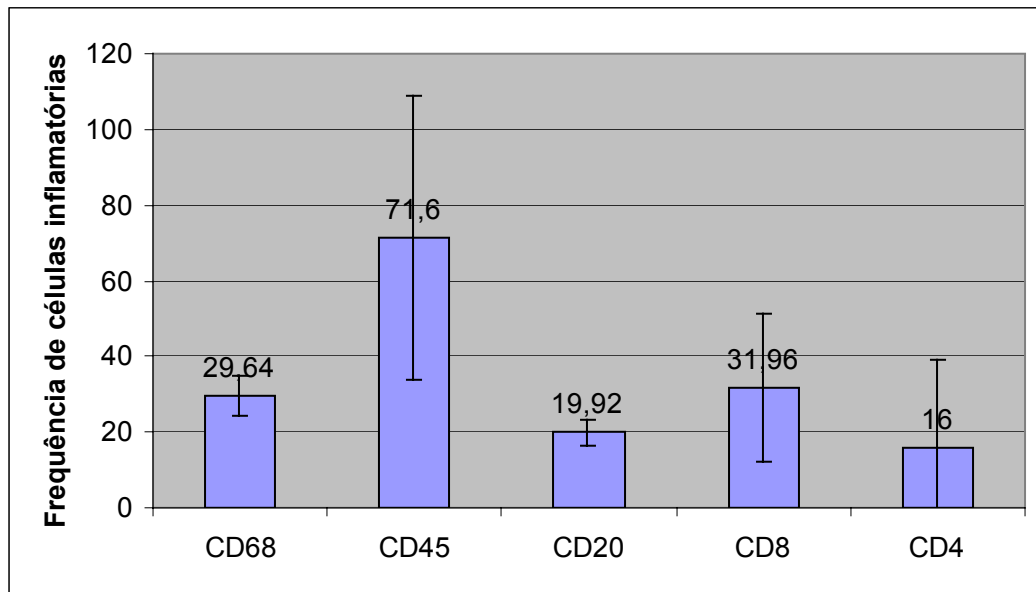


Figura 7 - Comparação entre médias da contagem de células imunopositivas para os anticorpos CD68, CD45, CD20, CD8 e CD4 nos 8 casos com padrão histopatológico de granulomas mal formados.

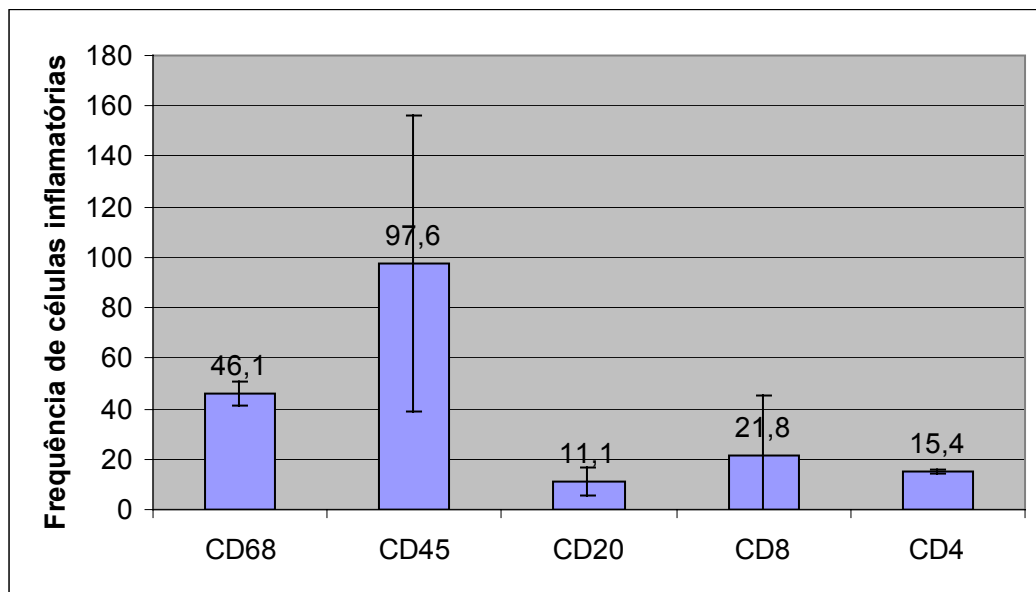


Figura 8 - Comparação entre médias da contagem de células imunopositivas para os anticorpos CD68, CD45, CD20, CD8 e CD4 nos 2 casos com padrão histopatológico macrofágico difuso.

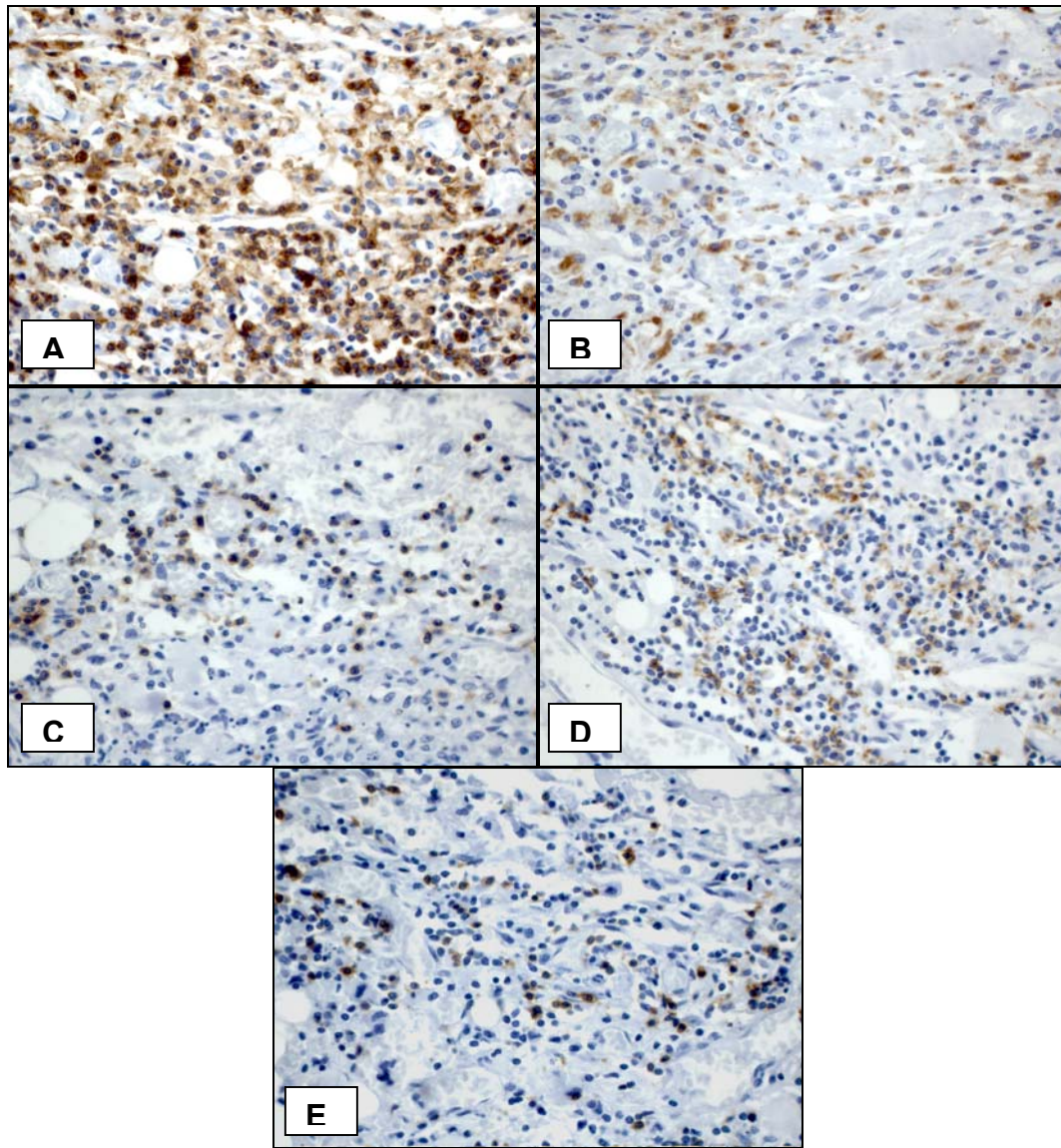


Figura 9 – Padrão imunológico da micobacteriose parotídea avaliado através de reações imunohistoquímicas em granulomas mal formados. A) marcação difusa e intensa para CD45; B) marcação ocasional moderada para CD68; C) esparsas células imunopositivas para CD8; D) área focal de marcação para CD 20; E) raras células imunopositivas para CD4 (Imunohistoquímica, 400x).

5.4 Reação em Cadeia da Ligase

A Reação em Cadeia da Ligase foi positiva em cinco dos 10 casos de micobacteriose parotídea. Os resultados fornecidos pelo aparelho de detecção do Ensaio LCx® *Mycobacterium tuberculosis*, Abbott, USA, são valores numéricos, os quais são considerados positivos ou negativos quando comparados com um valor de corte oferecido a cada reação. Os controles negativos e o calibrador que acompanham o Ensaio LCx® são utilizados para calcular o valor de corte do aparelho em cada reação. O valor de corte é obtido pela multiplicação da média dos controles positivos por 0,3. O resultado de cada amostra analisada é obtido pela divisão do valor de cada amostra (Rate) pelo valor de corte. Portanto, os valores acima de 1 foram considerados positivos e os abaixo de 1, negativos. Dos 10 casos analisados, 5 foram positivos para o Ensaio LCx® (*Mycobacterium tuberculosis*, Abbott, USA). Portanto, nos casos 6, 7, 8, 9 e 10 foi realizada a detecção da sequência gênica que codifica a proteína antigênica b, específica do complexo *M. tuberculosis*. Os dados do Ensaio LCx encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultado do Ensaio LCx® *Mycobacterium tuberculosis*, Abbott, USA, realizado nos 10 casos de micobacteriose parotídea.

Ensaio	Especificação	Valor (Rate)	Rate/valor de corte	Resultado
1	Controle (-)	11,9		
2	Controle (-)	12,3		
3	Controle (+)	1292,9		
4	Controle (+)	1181,2		
5	Caso 1	16,3	0,04	NEGATIVO
6	Caso 2	12,8	0,03	NEGATIVO
7	Caso 3	12,0	0,03	NEGATIVO
8	Caso 4	12,2	0,03	NEGATIVO
9	Caso 5	15,5	0,04	NEGATIVO
10	Caso 6	981,3	2,64	POSITIVO
11	Caso 7	1935,4	5,22	POSITIVO
12	Caso 8	1594,5	4,30	POSITIVO
13	Caso 9	2530,1	6,82	POSITIVO
14	Caso 10	2389,6	6,44	POSITIVO

Média dos controles negativos	12,10
Média dos controles positivos	1237,05
Valor de corte	371,12

5.5 Reação em Cadeia da Polimerase

O primeiro ensaio de PCR (PCR Nested) possibilitou a amplificação de pequena região de gene responsável pela codificação de proteína antigênica de 65kDa (Proteína de choque térmico) conservada entre as espécies de *Mycobacterium*. Os primers internos amplificaram um fragmento de 142-pb. Esta PCR permitiu confirmar, em material parafinado, que todos os casos estavam infectados por alguma espécie do gênero *Mycobacterium* (Figura 10).

Já o segundo ensaio de PCR (PCR Nested) permitiu a amplificação de segmento da sequência de inserção IS6110, que possibilitou a identificação de espécies do "complexo *M. tuberculosis*" em material parafinado. Os primers internos amplificaram um fragmento de 123-bp. Dos 10 casos analisados, 5 casos foram fortemente positivos e 3 fracamente positivos. Os casos 3, 7, 8, 9 e 10 foram fortemente positivos e os casos 2, 5 e 6 foram fracamente positivos (Figura 11). Portanto a PCR permitiu identificar 3 casos além daqueles detectáveis pela LCR. Dos 10 casos analisados 8 (80%) estavam infectados pelo "complexo *Mycobacterium tuberculosis*".

O terceiro ensaio de PCR, permitiu a identificação da espécie *Mycobacterium avium* através da identificação e amplificação de um segmento de 106-pb da IS1245 por PCR simples em material fixado em formol e emblocado em parafina. A infecção foi observada em apenas um caso, o caso 2 (Figura 12), o qual estava co-infectado pelo "complexo *M. tuberculosis*".

A Tabela 2 traz um resumo dos dados encontrados nos 10 casos de micobacteriose parotídea analisados neste estudo.

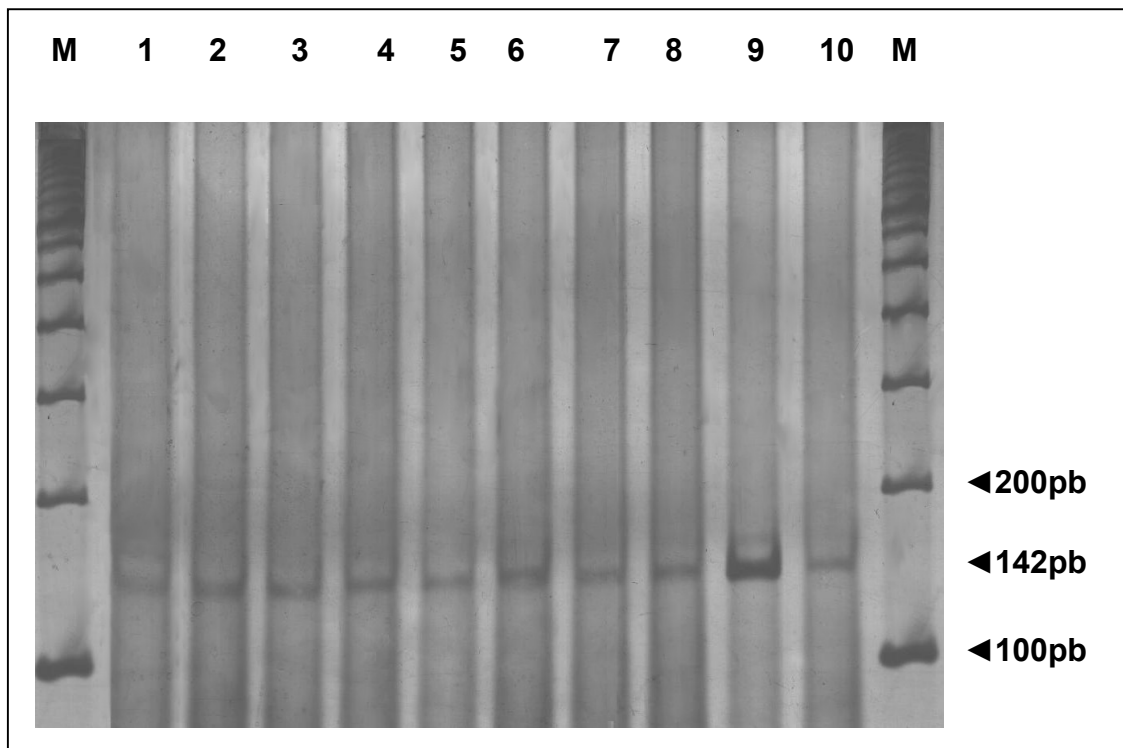


Figura 10 - Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata, para visualização dos produtos da reação de Nested PCR dos 10 casos, para amplificação de pequena região de gene responsável pela codificação de proteína antigênica de 65kDa (Proteína de choque térmico) conservada entre as espécies de *Mycobacterium* (142-pb). Canaletas de 1 a 10, amostras de 1 a 10. M, Marcador de peso molecular (100pb).

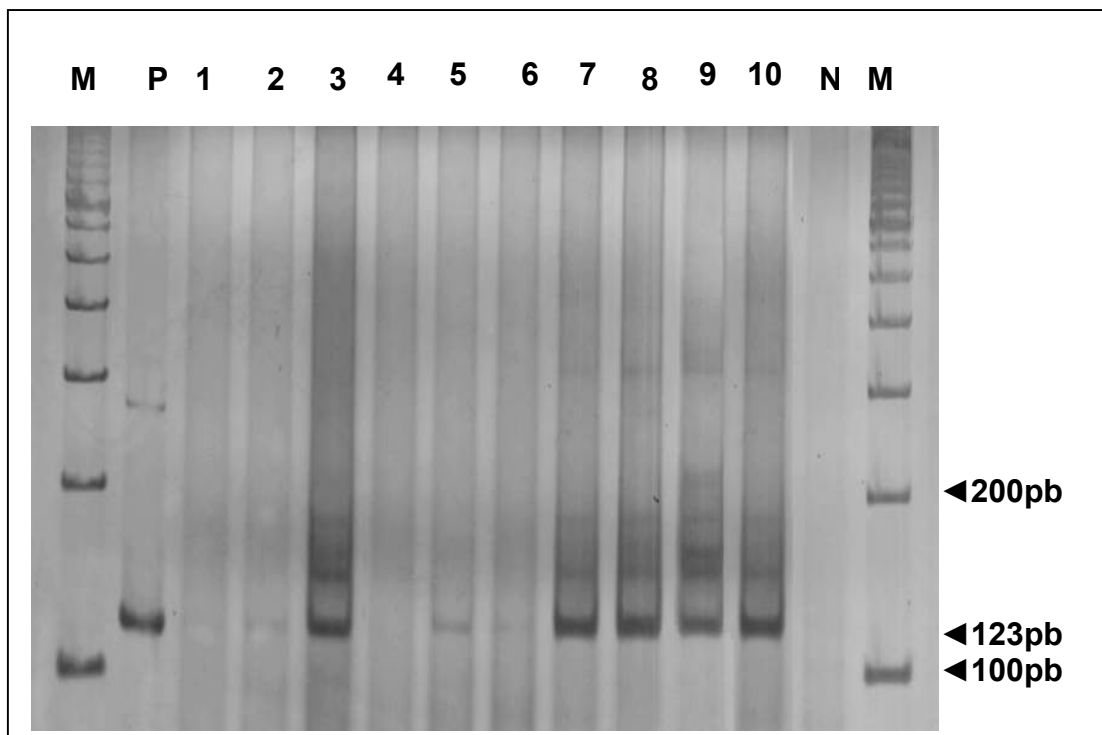


Figura 11 - Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata, para visualização dos produtos da reação de Nested PCR dos 10 casos, para amplificação da *IS6110* (123-pb) representada em múltiplas cópias no genoma do complexo *M. tuberculosis*. Canaletas de 1 a 10, amostras de 1 a 10. M, Marcador de peso molecular. P, Controle positivo - Amostra padrão MT14323. N, Controle negativo (Fígado).

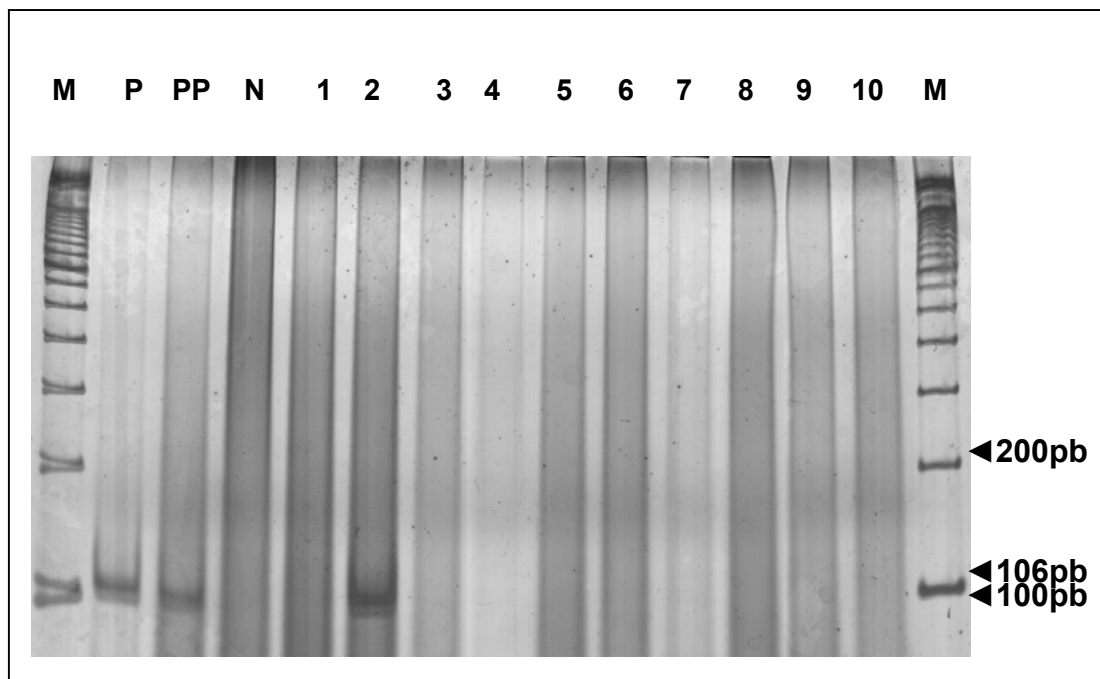


Figura 12 - Gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata, para visualização dos produtos da reação de PCR dos 10 casos, para amplificação da IS1245 (106-pb) presente no genoma do *M. avium*. Canaletas de 1 a 10, amostras de 1 a 10. M, Marcador de peso molecular. P, Controle positivo - Amostra padrão IWGMT49. PP, Controle positivo de material parafinado-bloco Embrapa. N, Controle negativo (Carcinoma de células escamosas).

Tabela 2 – Dados clínicos, microscópicos, imunohistoquímicos e moleculares dos 10 casos de micobacteriose parotídea avaliados neste trabalho.

Caso	Idade	Gênero	Padrão	Linfonodo	Parênquima	ZN	IH	LCR	PCR1	PCR2	PCR3
	(anos)		histopatológico		glandular						
1	46	M	MD	Sim	Sim	+	+	-	+	-	-
2	46	M	MD	Sim	Sim	+	+	-	+	+	+
3	69	M	GM	Sim	Não	+	+	-	+	+	-
4	27	M	GM	Sim	Não	+	+	-	+	-	-
5	52	M	GM	Sim	Não	+	+	-	+	+	-
6	46	M	GM	Sim	Não	+	+	+	+	+	-
7	43	M	GM	Sim	Não	+	+	+	+	+	-
8	24	M	GM	Sim	Sim	+	+	+	+	+	-
9	29	F	GM	Sim	Não	+	+	+	+	+	-
10	22	F	GM	Sim	Não	+	+	+	+	+	-

M, Masculino; F, Feminino; MD, Macrofágico difuso; GM, Granulomas mal formados; ZN, coloração de Ziehl-Neelsen; IH, Imunohistoquímica para BCG; LCR, Reação em Cadeia da Ligase; PCR1, Primeiro ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase; PCR2, Segundo ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase; PCR3, Terceiro ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase.

6. DISCUSSÃO

O ressurgimento da tuberculose está amplamente relacionada com a epidemia da AIDS. Além disso, a tuberculose é a infecção oportunista mais importante que acomete indivíduos HIV+ (Perlman *et al.* 1999) e uma das principais causas de morte em pacientes com AIDS (Chehter *et al.* 2000). Em nosso estudo, todos os pacientes apresentaram como causa *mortis* insuficiência respiratória ou sepse associada a micobacteriose disseminada. Em outros estudos *postmortem* (exceto Vargas *et al.* 2003), a micobacteriose não foi detectada na glândula parótida ou em outras glândulas salivares, provavelmente em função de características próprias da população estudada (Ihrler *et al.* 1996, Wagner *et al.* 1996). Chehter *et al.* (2000) estudaram o pâncreas em um grupo de pacientes autopsiados com AIDS (n=109) e reportaram uma alta incidência de micobacteriose clinicamente silenciosa (22% dos casos).

Em nosso estudo quatro pacientes (40%) apresentavam idade inferior a 30 anos e a média de idade total dos pacientes foi de 40,4 anos. Em trabalho realizado por Song *et al.* (2003) a faixa etária predominante, entre pacientes com comorbidade AIDS/TB, foi de 20 a 39 anos.

Histologicamente os 10 casos de micobacteriose afetaram linfonodos intraparotídeos e apenas 3 casos acometeram o parênquima glandular. Uma distribuição similar de acometimento parotídeo já foi reportada em pacientes HIV-negativos com tuberculose, e provavelmente reflita mais uma disseminação linfática de micobactérias do que uma predileção pela glândula parótida por si só (Franzen *et al.* 1997). O padrão histológico da tuberculose reflete a imunidade celular dos pacientes. Pacientes com imunidade celular intacta possui resposta granulomatosa típica com poucos bacilos (Lewin-Smith *et al.* 1998). Caso haja uma diminuição do número de linfócitos T CD4 ocorre uma diminuição da imunidade celular, diminuindo a formação de células gigantes tipo Langhans e células epitelióides. No estágio hiporeativo a necrose caseosa central possui inúmeros bacilos, tanto na área de necrose quanto nos macrófagos, sendo

detectados pela coloração de Ziehl-Neelsen. No estágio final da AIDS, há uma resposta piohistiocítica com inúmeros bacilos (Lewin-Smith *et al.* 1998). Provavelmente por nossos pacientes possuírem AIDS em estágio avançado não detectamos em nenhum caso resposta granulomatosa típica, sendo que 8 casos apresentaram granulomas mal formados com extensas áreas de necrose e inúmeros bacilos, e 2 casos padrão macrofágico difuso. Células gigantes do tipo Langhans não foram visualizadas.

Analisando as reações imunohistoquímicas usadas para detectar as células inflamatórias presentes nos 10 casos de micobacteriose parotídea, observamos que os macrófagos foram as mais freqüentes, seguidas pelos linfócitos TCD8, linfócitos B e linfócitos TCD4. Estes dados estão de acordo com Boom *et al.* (2003), os quais revisando a resposta imunológica humana contra o *M. tuberculosis*, descreveram serem os macrófagos seguidos pelas células T CD4, e outros subtipos de células T, como células T CD8, células T gamadelta e células T CD1 participantes centrais da resposta imunológica contra a tuberculose. Em nosso estudo os linfócitos TCD4 foram as células menos freqüentemente encontradas, devido a profunda imunossupressão dos pacientes e pela predileção do HIV por estas células.

O diagnóstico de micobacteriose é muitas vezes difícil de ser realizado. Nos casos analisados neste trabalho, observou-se uma grande quantidade de micobactérias nas parótidas, principalmente nos linfonodos intraparotídeos. Em função disso, as técnicas empregadas para a detecção do gênero *Mycobacterium* (coloração de Ziehl-Neelsen, imunohistoquímica para BCG e PCR) foram positivas para os 10 casos. A coloração de Ziehl-Neelsen é uma técnica de reação álcool-ácido-resistente e, pelo alto conteúdo lipídico da parede celular das micobactérias, possui a capacidade singular de fixar o corante fucsina de tal modo que não sofra descoloração pelo álcool-ácido. Essa coloração aliada às características de forma e tamanho é extremamente útil na detecção de infecções micobacterianas e no controle do tratamento de doenças provocadas por essas bactérias. Também é de grande valia, em função de sua fácil execução, baixo custo e especificidade, além

do que um único bacilo já é indicativo de positividade. Entretanto, foi estimado que em amostras de escarro são necessários cerca de 10.000 (10^4) bacilos por mililitro de escarro para que sejam detectados microscopicamente, o que em contrapartida o torna um exame de baixa sensibilidade. Além disso, outras variáveis como forma de coleta do material e forma de processamento podem diminuir a eficácia deste método diagnóstico. Pacientes com doença grave eliminam grande número de micobactérias, apresentando boa correlação entre esfregaço positivo e cultivo microbiológico positivo. Muitos pacientes apresentam doença leve e menos avançada e a correlação entre esfregaços e cultivos positivos nesse grupo pode ser de 25 a 40% apenas. Entretanto, mesmo após a repetição da pesquisa de BAAR, esses pacientes podem continuar apresentando resultados negativos, mas com evidência clínica de doença (Koneman *et al.* 2001).

Embora o diagnóstico inicial de doença micobacteriana seja baseado em evidências clínicas, o diagnóstico definitivo envolve o isolamento e a identificação em laboratório do microrganismo causador, o que pode ser difícil (Koneman *et al.* 2001). O procedimento laboratorial usual, como já foi dito, consiste na descontaminação, digestão do espécime, pesquisa microscópica de bacilos álcool-ácidos-resistentes (coloração de Ziehl-Neelsen), isolamento do microrganismo em cultura, identificação e teste de sensibilidade às drogas do agente infeccioso. O padrão ouro para o diagnóstico de tuberculose é a cultura microbiológica. Entretanto, a velocidade de crescimento de algumas micobactérias, incluindo o *M. tuberculosis* é extremamente lenta e requer incubação por volta de 3 a 8 semanas em meio sólido, levando portanto, algumas semanas para a obtenção dos resultados. A cultura apesar de sensível (detecta de 10 a 100 microrganismos por amostra), requer microrganismos viáveis podendo falhar em pacientes que já estejam sob tratamento anti-TB (Harries & Maher 1996). Cerca de 85% dos casos de tuberculose confirmados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, são positivos para a cultura (Nagesh *et al.* 2001). Entretanto, na cultura pode haver contaminação laboratorial gerando resultados falso-positivos. Por conseguinte, esses fatos resultam na necessidade da realização de outros

exames, testes ou técnicas, mais sensíveis e rápidas que possam contribuir para o diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes, uma vez que a detecção do agente etiológico e o tratamento eficaz são a chave do sucesso no controle das doenças micobacterianas (Nagesh *et al.* 2001). Em nossa casuística apenas um caso foi positivo para cultura micobacteriana, entretanto não foi realizada a tipificação da micobactéria.

Nos últimos 10 anos, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção direta, identificação e teste de susceptibilidade das micobactérias às drogas. Esses métodos podem reduzir potencialmente o tempo do diagnóstico de semanas a dias, embora requeiram equipamentos sofisticados e pessoal técnico altamente qualificado.

A aplicação de técnicas moleculares para a identificação e diferenciação de isolados bacterianos tem-se revelado uma poderosa ferramenta da microbiologia auxiliando decisivamente as investigações epidemiológicas (Maslow *et al.* 1993). Por isso neste trabalho, além dos métodos convencionais já rotineiramente utilizados avaliamos outros métodos diagnósticos como a imunohistoquímica, PCR e LCR. Em nosso trabalho as técnicas de Ziehl-Neelsen, imunohistoquímica (anticorpo anti-BCG) e PCR, para detecção do gênero *Mycobacterium* foram positivas nos 10 casos. Entretanto, os casos estavam intensamente infectados, o que provavelmente tenha aumentado a sensibilidade de técnicas menos sensíveis como a coloração de Ziehl-Neelsen e imunohistoquímica. Ohtomo *et al.* (2000) comparando resultados entre a coloração de Ziehl-Neelsen, imunohistoquímica e PCR, encontraram que a imunohistoquímica mostrou ter a mesma sensibilidade que a coloração de Ziehl-Neelsen, enquanto a PCR apresentou maior positividade na identificação do *Mycobacterium*. A marcação pelo anticorpo anti-BCG não nos parece de grande valia em especial em casos paucibacilares, uma vez que a marcação não permite visualização clara da morfologia do bacilo, o que pode dificultar o diagnóstico. Além disso, este anticorpo apenas identifica o gênero *Mycobacterium*, não sendo possível realizar a caracterização das espécies.

Atualmente a técnica da PCR está bem desenvolvida e vem sendo extensivamente utilizada para o diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas (Nagesh *et al.* 2001). Apesar de requerer pessoal técnico especializado, reagentes, equipamentos sofisticados e caros parece ser de grande valia. Além da alta especificidade, a sensibilidade é alta e particularmente útil em casos de monitoramento do tratamento, ou em casos onde outros métodos falharam em detectar o bacilo (Salian *et al.* 1998). Rivera *et al.* (2003) detectaram um caso de tuberculose oral primária no qual o diagnóstico só foi possível mediante a utilização da PCR. Em trabalho realizado por Rish *et al.* (1996), os autores demonstraram que a PCR feita em tecido parafinado pulmonar de rato, experimentalmente infectado por uma cepa padrão de *M. tuberculosis*, detectou cerca de 9 microrganismos em uma secção de tecido de 5µm de espessura. Além da rápida (2 a 3 dias) e fácil execução em comparação à cultura.

A LCR por tratar-se de um kit comercial e por requerer equipamentos específicos parece não estar mais sendo utilizada. De acordo com o manual do fabricante (Abbott LCx Probe System, Abbott Laboratórios do Brasil) após 30-40 ciclos a sequência alvo poderá ter um bilhão de cópias. Entretanto, apesar da alta sensibilidade descrita pelo manual do fabricante, e após um período de intensas publicações no ano de 1998 com resultados variáveis (Ausina *et al.* 1997, e Lindbräthen *et al.* 1997, Tortoli *et al.* 1997, Moore & Curry 1998, Rohner *et al.* 1998, Garrino *et al.* 1999, Viinanen *et al.* 2000) comparando-se esta com a cultura microbiológica e com outras técnicas moleculares, a técnica parece não estar sendo extensivamente utilizada. Em função disso, a PCR parece ser a técnica preferencial na identificação de seqüências de inserção espécies-específicas. Apesar de muitas seqüências estarem sendo descritas constantemente, a IS6110 parece ser até o momento a mais indicada para identificação do "complexo *M. tuberculosis*" e a IS1245 para a identificação do *M. avium*.

Já o desenvolvimento e padronização de técnica utilizada para identificação molecular de patógenos micobacterianos em material parafinado é também de muita utilidade, em especial em casos que a princípio não foram suspeitos ou

onde a coleta de material para cultura não tenha sido feita. Além disso, a PCR não está restrita à presença de microrganismos viáveis, permitindo o diagnóstico retrospectivo de TB em material parafinado. Apesar das dificuldades encontradas para a amplificação, devido às alterações físico-químicas causadas no DNA em função da fixação pelo formol, neste trabalho conseguimos identificar por PCR o gênero *Mycobacterium* em todos os casos. A PCR permitiu também fazer a identificação do "complexo *M. tuberculosis*" em 8 dos 10 casos (80%) e do *M. avium* em 1 caso (10%). Já a LCR permitiu identificar apenas 5 dos 10 casos, o que comparativamente a PCR, mostrou sensibilidade inferior (50%). Alguns trabalhos trazem o uso da PCR em material parafinado tanto com a utilização da IS6110 (Marchetti *et al.* 1998, Salian *et al.* 1998, Vago *et al.* 1998, Hsiao *et al.* 2003) para identificação do "complexo *M. tuberculosis*" como da IS1245 para o *M. avium* (Ferreira *et al.* 2002) com resultados satisfatórios. Em nosso trabalho identificamos a presença de infecção pelo *M. avium* em 1 caso, o qual estava também infectado pelo *M. tuberculosis*. Através da PCR foi possível realizar uma distinção de espécies. O *M. tuberculosis* é o principal causador de infecções humanas (Kim *et al.* 2001) e o *M. avium* é em pacientes portadores de AIDS, quase sempre a espécie envolvida, em uma porcentagem entre 87 e 98% dos isolados (Inderlied 1993; Devallois & Rastogi 1997). Dos 10 casos analisados neste trabalho, não foi possível determinar a espécie em dois casos (casos 1 e 4). Atribuímos este fato a infecção por outras espécies não-tuberculosas, embora não possa ser excluída a possibilidade de resultados falso-negativos, especialmente no caso 4, no qual a concentração de DNA obtida foi extremamente baixa. Deste modo, o volume de DNA adicionado à reação foi grande, o que pode ter gerado um resultado falso-negativo em função de possíveis inibidores presentes no DNA.

Com relação à metodologia empregada na realização das reações de PCR, sabe-se que a fixação pode interferir na amplificação. Alguns inibidores endógenos podem ser induzidos pela fixação ou por outras etapas do processamento do tecido. Uma forma de reduzir estes inibidores seria a diminuição da concentração do DNA. Por outro lado reduzindo a concentração do

DNA há a possibilidade de diminuir a sensibilidade da PCR, especialmente em lesões paucibacilares, e facilitar a formação de "primers-dimers" (Coates *et al.* 1991, Marchetti *et al.* 1998). Os últimos autores avaliaram diferentes ensaios de PCR, com diferentes concentrações de DNA. Encontraram piores resultados em termos de sensibilidade, quando realizou-se a PCR com 5µg, em comparação a 1 ou 3µg. O protocolo usado no presente trabalho foi baseado nos protocolos desses autores e realizamos a amplificação com a concentração de 3µg de DNA em todos os ensaios de PCR, exceto no primeiro ensaio (identificação do gênero *Mycobacterium*), no qual utilizamos a quantidade de 5µg de DNA. Os autores, encontraram um alto número de falsos negativos com 5 µg, o que provavelmente esteja relacionado com uma grande quantidade de inibidores. Entretanto, este fato não se aplicou ao nosso estudo, uma vez que obtivemos positividade para o gênero *Mycobacterium* nos 10 casos avaliados. Outro fator importante na amplificação a partir de material parafinado é o tamanho do produto a ser amplificado, em função da alta degradação dentro da cadeia polinucleotídica em tecidos fixados em formol e emblocados em parafina. Isto é particularmente verdadeiro no genoma do *M. tuberculosis* em função da alta taxa de guaninas e citosinas, uma vez que o formol possui a capacidade de se ligar aos grupos amino-terminais presentes nesses nucleotídeos (Marchetti *et al.* 1998). Esses autores encontraram melhores resultados com primers menores (106 e 123pb), o que sugere que uma correta escolha de primers, que amplifiquem seqüências de DNA relativamente pequenas com menor chance de fragmentação, pode favorecer a amplificação e aumentar a sensibilidade da técnica. Além disso, o número de cópias do fragmento-alvo dos primers também está relacionado à eficácia da amplificação. A IS6110 está geralmente presente em múltiplas cópias no genoma de virtualmente todos os membros do "complexo *M. tuberculosis*" (Roth *et al.* 1997) e a IS1245 apresenta uma média aproximada de 20 cópias (Guerrero *et al.* 1995), oferecendo um alto poder discriminatório.

Nossos resultados de forma semelhante aos dados encontrados na literatura, sugerem que a amplificação e identificação molecular de espécies de

Mycobacterium a partir de material parafinado é possível e pode auxiliar no estudo retrospectivo de TB ou em casos inicialmente não suspeitos clinicamente.

Em resumo, a micobacteriose parotídea em pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada apresentou uma resposta imunológica predominantemente linfomononuclear com granulomas mal formados. As técnicas de Ziehl-Neelsen, Imunohistoquímica (anticorpo anti-BCG) e PCR apresentaram o mesmo nível de sensibilidade para identificar o gênero *Mycobacterium*. A identificação do *M. tuberculosis* por PCR nas parótidas é mais sensível que a LCR. Além disso, a PCR permitiu realizar a identificação do *M. tuberculosis* e *M. avium* de forma rápida e eficaz em material parafinado abrindo perspectivas animadoras para sua aplicação clínica no diagnóstico de casos de micobacteriose nos laboratórios de patologia.

7. CONCLUSÕES

1. A micobacteriose parotídea na AIDS em fase avançada acometeu principalmente os linfonodos intraparotídeos manifestando-se histologicamente como granulomas mal-formados.
2. A resposta inflamatória contra a micobacteriose parotídea na AIDS em fase avançada caracterizou-se predominantemente por macrófagos, seguidos por linfócitos TCD8, linfócitos B e linfócitos TCD4.
3. Entre os métodos diagnósticos do gênero *Mycobacterium* a sensibilidade foi a mesma para as 3 técnicas empregadas: coloração de Ziehl-Neelsen, imunohistoquímica para BCG e PCR, em função da intensa infecção dos tecidos.
4. Entre as técnicas utilizadas para detecção do complexo *M.tuberculosis*, a PCR mostrou-se mais eficaz que a LCR.
5. A PCR permitiu identificar co-infecção pelas espécies *M. tuberculosis* e *M. avium* em um caso desta amostra.
6. *M. tuberculosis* foi a espécie mais incidente na micobacteriose parotídea de pacientes com AIDS em fase avançada.
7. Nossos resultados sugerem que a amplificação e identificação molecular de espécies de *Mycobacterium* a partir de material parafinado usando a técnica de PCR é rápida e eficaz, podendo auxiliar no estudo retrospectivo de TB e em casos inicialmente não suspeitos clinicamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ammar-Khodja M. Primary tuberculosis of the submaxillary gland. Apropos of a case. **Rev Laryngol Otol Rhinol** 1986; 107(1): 69-70.

Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, Manterola JM, Lonca J, Matas L *et al.* Evaluation of the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* Assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. **J Clin Microbiol** 1997; 35: 1996-2002.

Beck-Sague C, Dooley S, Hutton MD, Otten J, Breeden A, Crawford JT *et al.* Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected patients. **JAMA** 1992; 268:1280–1286.

Bhat NA, Stansbie JM. Tuberculous parotitis: a case report. **J Laryngol Otol** 1996; 110(10): 976-977.

Birkenmeyer L, Armstrong AS. Preliminary evaluation of the ligase chain reaction for specific detection of *Neisseria gonorrhoeae*. **J Clin Microbiol** 1992; 30: 3089-3094.

Boletim Epidemiológico do Programa DST-AIDS. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde. Incidência Média de AIDS no Brasil por unidade da Federação e período de diagnóstico. 1998; ano XVI; número 02.

Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis** 2003; 83: 98-106.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da Tuberculose**, 2ª ed., Rio de Janeiro, 1994, 115p.

Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. **Lancet** 1989; 4:1069-1071.

Chaisson RE, Gallant JE, Keruly JC, Moore RD. Impact of opportunist disease on survival in patients with HIV infection. **AIDS** 1998; 12(1): 29-33.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Chaisson RE, Moore RD, Richman DD, Deruly J, Creagh T. The zidovudine epidemiology study group. Incidence and natural history of *Mycobacterium avium*-complex infection in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. **Am Rev Respir Dis** 1992; 146: 285-289.

Chehter EZ, Longo MA, Laudanna AA, Duarte MI. Involvement of the pâncreas in AIDS: a prospective study of 109 post-mortems. **AIDS** 2000 8; 14(13): 1879-1886.

Cleary KR, Batsakis JG. Mycobacterial disease of the head and neck: current perspective. **Ann Otol Rhinol Laryngol** 1995; 104: 830-834.

Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. **Immunol Today** 1993; 14(3): 107-111.

Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS, *et al.* Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. **J Clin Invest** 1989; 84(6): 1892-1899.

Coates PJ, d'Ardenne AJ, Khan G, Kangro HO, Slavin G. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. **J Clin Pathol** 1991; 44: 115-118.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Cruciani M, Malena M, Bosco O, Gatti G, Serpelloni G. The impact of Human Immunodeficiency Virus type 1 on Infectiousness of Tuberculosis: a Meta analysis. **Clinical Infectious Diseases** 2001; 33: 1922-1930.

Crump JA, Reller B. Two decades of Disseminated Tuberculosis at a University Medical Center: The Expanding Role of Mycobacterial Blood Culture. **Clin Infect Dis** 2003; 37: 1037-1043.

Damsker B, Bottone EJ. *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* from the intestinal tracts of patients with the acquired immunodeficiency

syndrome: concepts regarding acquisition and pathogenesis. **J Infect Dis** 1985; 151: 179-181.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **J Immunol** 1993; 150(2): 353-360.

Devallois A, Rastogi N. Computer-assisted analysis of *Mycobacterium avium* fingerprints using insertion elements IS1245 and IS1311 in a Caribbean setting. **Res Microbiol** 1997; 148: 703-713.

Di Leonardo M, Isola NC, Ambroggi M, Rybko A, Poggi S. Mycobacteria in HIV-infected patients in Buenos Aires. **Tuber Lung Dis** 1995; 3: 185-189.

Dooley SW JR, Castro KG, Hutton MD, Mullan RJ, Polder JA, Snider DE Jr. Guidelines for preventing the transmission of tuberculosis in health-care setting, with special focus on HIV-related issues. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 1990; 39(RR-17): 1-29.

Eguchi J, Ishihara K, Watanabe A, Fukumoto Y, Okuda K. PCR Method is essential for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in oral cavity samples. **Oral Microbiol Immunol** 2003; 18: 156-159.

Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin Microbiol Rev** 1996; 9: 177-215.

Ferreira RM, Saad MH, Silva MG, Fonseca L de S. Non-tuberculous mycobacteria I: one year clinical isolates identification in Tertiary Hospital AIDS Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in pre highly active antiretroviral therapy era. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002; 97(5): 725-729.

Fiallo P, Williams DL, Chan GP, Gillis TP. Effects of fixation on polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium leprae*. **J Clin Microbiol** 1992; 30: 3095-3098.

Franzen A, Franzen CK, Koegel K. Tuberculosis of the parotid gland: a rare differential diagnosis of parotid tumor. **Laryngorhinootologie** 1997; 76(5): 308-311.

Franzetti F, Gori A, Vezzoli S, Rossi C, Esposti D, Bandera A *et al.* Epidemiology of *Mycobacterium avium* infection in northern Italy. **AIDS** 1997; 11(8): 1065-1066.

French AL, Benator DA, Gordin FM. Nontuberculous Mycobacterial Infections. **Medical Clinics of North America** 1997; 81(2): 361-375.

Frothingham R, Wilson KH. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. **J Bacteriol** 1993; 175: 2182-2825.

Garrino MG, Glupczynski Y, Degraux J, Nizet H, Delmee M. Evaluation of the Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in human samples. **J Clin Microbiol** 1999; 37(1): 229-232.

Glândulas salivares. *In*: Mjor IA, Fejerskov O. **Embriologia e Histologia Oral Humana**. Ed. Médica Panamericana: Copenhagen: Munksgaard; 1990. p. 243-275.

Graziosi C, Pantaleo G, Gant KR, Fortin JP, Demarest JF, Cohen OJ *et al.* Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. **Science** 1994; 265(5169): 248-252.

Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. **Am J Clin Pathol** 1991; 95: 117-124.

Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, Bodmer T, Telenti A. A novel Insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. **J Clin Microbiol** 1995; 33 (2): 304-307.

Harries AD, Maher D. **TB/HIV A clinical manual** 1996, disponível em: URL: http://www.who.int/gtb/publications/tb_hiv/ [2003 Dec. 02]

Havir DV, Ellner JJ. *Mycobacterium avium* complex. *In*: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 5th ed. New York, Churchill Livingstone; 2000. p.2630-2635.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Willins ST *In*: **Bergey's manual of Determinative Bacteriology**. 5th ed. U.S.A., Williams & Wilkins; 1994. p.597-603.

Hornsburg Jr CR, Chin DP, Yajko DM, Hopewell PC, Nassos PS, Elkin EP *et al.* Environmental risk factors for acquisition of *Mycobacterium avium* complex in persons with human immunodeficiency virus infection. **J Infect Dis** 1994; 170: 362-367.

Hsiao PF, Tzen CY, Chen HC, Yi Su H. Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. **Int J Dermat** 2003; 42: 281-286.

Ihrler S, Zietz C, Riederer A, Diebold J, Lohrs U. HIV-related parotid lymphoepithelial cysts. Immunohistochemistry and 3-D reconstruction of surgical and autopsy material with special reference to formal pathogenesis. **Virchows Arch** 1996 Oct; 429(2-3):139-47.

Impraium CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. **Biochem Biophys Res Commun** 1987; 142: 710-716.

Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez EM. The *Mycobacterium avium* complex. **Clin Microbiol Rev** 1993; 6(3): 266-310.

Jacobson MA, Hopewell PC, Yajko DM, Hadley WK, Lazarus E, Mohanty PK *et al.* Natural history of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. **J Infect Dis** 1991; 164: 994-998.

Jakob AR, Kuhl M, Wilmanns W, Schalhorn A. Junger mann mit schwellung der linken halsseite und des rechten hodens. **Internist** 1995; 36: 1080-1084.

Janmeja AK, Das SK, Kochhar S, Handa U. Tuberculosis of the parotid gland. **Indian J Chest Dis Allied Sci** 2003; 45(1): 67-69.

Jouveshomme S, Cambau S, Trystram D, Szpytma M, Sougakoff W, Derenne JP *et al.* Clinical utility of an amplification test based on ligase chain reaction in pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 158(4): 1096-1101.

Kim BJ, Lee KH, Park BN, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ *et al.* Differentiation of

Mycobacterium Species by PCR-Restriction Analysis of DNA (342 Base Pairs) of the RNA Polymerase Gene (*rpo*). **J Clin Microbiol** 2001; 39(6): 2102-2109.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. **Diagnóstico microbiológico – Texto e Atlas colorido**. 5^a. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.

Kuritzkes DR. **HIV pathogenesis and viral markers**. Healthcare communications group 1996, disponível em: URL: <http://www.healthcg.com/pathogenesis/graphics/hivpvmhome.map?> 226,448.

Laffler TG, Carrino JJ, Marshall RL. The ligase chain reaction in DNA-based diagnosis. **Ann Biol Clin** 1993; 50: 821-826.

Leão SC, Briones MRS, Sircilli MP, Balian SC, Mores N, Ferreira-Neto JSF. Identification os two novel *Mycobacterium avium* Allelic variants in Pig and Human isolates from Brazil by PCR-Restriction Enzyme Analysis. **J Clin Microbiol** 1999; 37 (8): 2592-2597.

Leite CQF, Viana BHT, Leite SRA, Juarez E. Incidence of *Mycobacterium tuberculosis* and other Mycobacteria on pulmonary infections in Araraquara-SP. **Rev Microbiol** 1995; 26 (2): 101-105.

Lewin-Smith MR, Klassen MK, Frankel SS, Nelson AM. Pathology of human immunodeficiency virus infection: Infectious conditions. **Annals of Diagnostic Pathology** 1998; 2(3): 181-194.

Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. **Microbiol Mol Biol Rev** 1999 Sep; 63(3):507-522.

Lindbrathen A, Gaustad P, Hovig B, Tonjum T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples from patients in Norway by ligase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1997; 35(12): 3248-3253.

Ljungqvist L, Andersen AB, Andersen P, Haslov K, Worsaae A, Bennedsen J *et al*. Affinity purification, biological characterization and serological evaluation of defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. **Trop Med Parasitol** 1990 Sep; 41(3): 333-335.

- Lumb R, Davies K, Dawson D, Gibb R, Gottlieb T, Kershaw C *et al*. Multicenter evaluation of the Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* ligase chain reaction assay. **J Clin Microbiol** 1999; 37(10): 3102-3107.
- Maggi E, Mazzetti M, Ravina A, Annunziato F, de Carli M, Piccinni MP *et al*. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. **Science** 1994; 265(5169): 244-248.
- Marchetti G, Gori A, Catozzi L, Vago L, Nebuloni M, Rossi MC *et al*. Evaluation of PCR in Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Formalin-Fixed, paraffin-Embedded Tissues: Comparison of Four Amplification Assays. **J Clin Microbiol** 1998; 36(6): 1512-1517.
- Matee MI, Scheutz F, Moshy J. Occurrence of oral lesions in relation to clinical and immunological status among HIV-infected adult Tanzanians. **Oral Dis** 2000; 6: 106-111.
- Mayaud C, Cadranel J. Tuberculosis in AIDS: past or new problems? **Thorax** 1999; 54 (7): 567-571.
- McAdam RA, Quan S, Guilhot C. Mycobacterial transposons and their applications. *In*: Hatfull GF, Jacobs Jr WR. **Molecular genetics of mycobacteria**. Washington, 2000. p.69-84.
- Menzies D, Fanning A, Yuan L, Fitzgerald M. Tuberculosis among health care workers. **N Engl J Med** 1995; 332: 92-98.
- Milleron B, Herman D, Francois T, Favre M, Gauthier JM, Akoun G. Biopsy of labial accessory salivary glands and tuberculosis. **Nouv Presse Med** 1982; 11(17): 1337.
- Molina-Gamboa JD, Ponce-De-Leon S, Sifuentes-Osornio J, Bodadilla Del Valle M, Ruiz-Palacios GM. Mycobacterial infection in Mexican AIDS patients. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 1996; 11(1): 52-58.
- Moore DF, Curry JI. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by Amplicor PCR. **J Clin Microbiol** 1998; 33: 2686-2691.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol** 1986; 136(7): 2348-2357.

Mullins JE, Ogle O, Cottrell DA. Painless Mass in the Parotid Region. **J Oral Maxillofac Surg** 2000; 58: 316-319.

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. St Louis, Missouri, American Society for Microbiology 1999. p.399.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS. **Medical Microbiology**. 3th ed. St. Louis, Missouri, Mosby Year Book Inc 1998. p.719.

Nagesh BS, Sehgal S, Jindal SK, Arora SK. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pleural Fluid. **Chest** 2001; 119 (6): 1737-1741.

Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockush JD, Cal SX, Wynne BA. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. **J Infect Dis** 1992; 165: 1082-1085.

Ohara Y, Honma M, Iwasaki Y. Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting human T-cell leukemia virus type I sequences in paraffin-embedded tissue: effect of unbuffered formalin fixation. **J Virol Methods** 1992; 37: 83-88.

Ohtomo K, Wang S, Masunaga A, Aikichi, Iwamoto, Sugawara I. Secondary infections of AIDS autopsy cases in Japan with special emphasis on *Mycobacterium avium-intracellulare* complex infection. **Tohoku J Exp Med** 2000; 192(2): 99-109.

Oliveira RS, Sircili MP, Oliveira EMD, Balian SC, Ferreira-Neto JS, Leão SC. Identification of *Mycobacterium avium* Genotypes with distinctive traits by Combination of IS1245-Based Restriction Fragment Length polymorphism and restriction analysis of hsp65. **J Clin Microbiol** 2003; 41 (1): 44-49.

Opravil M. Epidemiological and clinical aspects of mycobacterial infections.

Infection 1997; 25 (1): 56-59.

Parker BC, Ford MA, Gruft H, Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculosis mycobacteria: IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. **Am Rev Respir Dis** 1983; 128: 652-656.

Perlman DC, El-Helou P, Salomon N. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. **Semin Respir Infect** 1999; 14 (4): 344-352.

Pestel-Caron M, Arbeit RD. Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. **J Infect Dis** 1998; 36 (7): 1859-1863.

Peters M, Muller C, Rusch-Gerdes S, Seidel C, Gobel U, Pohle HD *et al.* Isolation of atypical mycobacteria from tap water in hospitals and homes: is this a possible source of disseminated MAC infection in AIDS patients? **J. Infect** 1995; 1(1): 39-44.

Picardeau M, Vincent V. Typing of *Mycobacterium avium* isolates by PCR. **J Clin Microbiol** 1996; 34: 389-392.

Piersimoni C, Callegaro A, Scarparo C, Penati V, Nista D, Bornigia S *et al.* Comparative evaluation of the new gen-probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. **J Clin Microbiol** 1998; 36 (12): 3601-3604.

Porter JD. Mycobacteriosis and HIV infections: the new public health challenge. **J Antimicrob Chemother** 1996; 37: 113-120.

Programa Nacional de DST e AIDS – Dados e Pesquisas 2003, disponível em: URL: <http://www.aids.gov.br/final/dados/dados.htm> [2003 Dec. 02].

Ramos MC, Villares MCB, Jaques M, Roscani ALC, Roscani GN, Alves EP. Estudo bacteriológico retrospectivo das infecções micobacterianas em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). **Braz J Infect Dis** 1999.

Reis VLL, Schmidt JM, Aguiar EJ, Azulay RD. Micobactérias atípicas. **Arq**

Bras Med 1984; 58 (3): 160-169.

Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Reddy MV, Gangadharam PRJ, Bates JH. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed tissue. **Am J Respir Crit Care Med** 1996; 153: 1419-1423.

Rivera H, Correa MF, Castillo-Castillo S, Nikitakis NG. Primary oral tuberculosis: a report of a case diagnosed by polymerase chain reaction. **Oral Dis** 2003 Jan; 9(1):46-48.

Rohner P, Jahn EI, Ninet B, Ionati C, Weber R, Auckenthaler R *et al.* Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis with the LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay and comparison with conventional diagnostic techniques. **J Clin Microbiol** 1998; 36(10): 3046-3047.

Rose DN, Vetter S, Gutman A. Diagnosis and management of tuberculosis in patients with HIV infection. **Mount Sinai J Med** 1998; 65 (1): 14-20.

Roth A, Schaberg T, Mauch H. Molecular diagnosis of tuberculosis: current clinical validity and future perspectives. **Eur J Respir Dis** 1997; 10: 1877-1891.

Rowe-Jones JM, Vowles R, Leighton SE, Freedman AR. Diffuse tuberculous parotitis. **J Laryngol Otol** 1992; 106(12): 1094-1095.

Ruiz-Manzano J, Manterola JM, Gamboa F, Calatrava A, Monso E, Martinez C *et al.* Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded pleural biopsy specimens by commercial ribosomal RNA and DNA amplification kits. **Chest** 2000; 118(3): 648-655.

Ruiz-Serrano MJ, Albadalejo J, Martinez-Sanches L, Bouza E. LCx: a diagnostic alternative for the early detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Diagn Microbiol Infect Dis** 1998; 32(4): 259-64.

Runyon EH. Pathogenic mycobacteria. **Bibl Tuberc** 1965; 21: 235-287.

Salian NV, Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Bates JH. Polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in Histologic Specimens. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 158: 1150-1155.

Sánchez TE, Lucíanéz ERR, Martínez FP. Tuberculosis parotídea. **Anales**

O.R.I. Iber. Amer. XX 1993; 4: 361-367.

Sangari FJ, Bachli M, Bermudez LE, Bodmer T. Characterization of IS666, a newly described insertion element of *Mycobacterium avium*. **Microb Comp Genomics** 2000; 5 (4): 181-188.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 1994; 17: 914-921.

Shafer RW, Edlin BR. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: Perspective on the past decade. **Clin Infect Dis** 1996; 22: 683-704.

Singh B, Balwally AN, Har-El G, Lucente FE. Isolated cervical tuberculosis in patients with HIV infection. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1998; 118(6): 766-770.

Smith MB, Boyars MC, Veasey S, Woods GL. Generalized tuberculosis in the acquired immune deficiency syndrome. **Arch Pathol Lab Med** 2000; 124 (9): 1267-1274.

Soini H, Musser JM. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. **Clinical Chemistry** 2001; 47: 809-814.

Song ATW, Schout D, Novaes HMD, Goldbaum M. Clinical and Epidemiological features of AIDS/Tuberculosis comorbidity. **Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo** 2003; 58 (4): 207-214.

Stanley RB, Fernandez JÁ, Peppard SB. Cervicofacial Mycobacterial infections presenting as Major Salivary Gland Disease. **Laryngoscope** 1983; 93: 1271-1275.

Thorel MF, Krichevsky M, Lévy-Frébault V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent Mycobacteria, amended description of *Mycobacterium avium*, and description of *M. avium* susp. *avium* subsp. nov., *M. avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov. and *M. avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. **Int Syst. Bacteriol** 1990; 40: 254-260.

Tortoli E, Lavinia F, Simonetti MT. Evaluation of a commercial ligase chain

reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. **J Clin Microbiol** 1997; 35: 2424-2426.

Tortoli E, Tronci M, Tosi CP, Galli C, Lavinia F, Natili S *et al.* Multicenter evaluation of two commercial amplification kits (Amplicor, Roche and LCx, Abbott) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. **Diagn Microbiol Infect Dis** 1999; 33(3): 173-179.

UNAIDS (The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) **AIDS Epidemic Update** 2003, disponível em: URL: http://www.unaids.org/wad/2003/Epiupdate2003_en/EpiUpdate2003_en.pdf [2003 Dec. 02].

Vago L, Barberis M, Gori A, Scarpellini P, Sala E, Nebuloni M *et al.* Nested polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 sequence on formalin-fixed paraffin-embedded tissues with granulomatous diseases for rapid diagnosis of tuberculosis. **Am J Clin Pathol** 1998; 109 (4): 411-415.

Van Der Walt JD, Leake J. Granulomatous sialadenitis of the major salivary glands. A clinicopathological study of 57 cases. **Histopathology** 1987; 11(2): 131-144.

van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J Infect Dis** 1993; 31 (2): 406-409.

van Soolingen D, Bauer J, Ritacco V, Leão SC, Pavlik I, Vincent V *et al.* IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. **J Clin Microbiol** 1998; 36 (10): 3051-3054.

Vargas PA, Mauad T, Böhm GM, Saldiva PHN, Almeida OP. Parotid gland involvement in advanced AIDS. **Oral Diseases** 2003; 9: 55-61.

Viinainen AH, Soini H, Marjamäki M, Liippo K, Viljanen MK. Ligase chain

reaction assay is clinically useful in the discrimination of smear-positive pulmonary tuberculosis from atypical mycobacterioses. **Ann Med** 2000; 32(4): 279-283.

Viveiros M, Pinheiro S, Moreira P, Pacheco T, Brum L. Evaluation of a commercial ligase chain reaction assay for the diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis** 1999; 3(6): 508-514.

von Reyn CF, Arbeit RD, Tosteson ANA, Barber TW, Wadell R, Sox CH *et al.* The international epidemiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. **AIDS** 1996; 10: 1025-1032.

Wagner RP, Tian H, McPherson MJ, Latham PS, Orenstein JM. AIDS-associated infections in salivary glands: autopsy survey of 60 cases. **Clin Infect Dis** 1996 Feb;22(2):369-71.

Watanabe M, Nakayama T, Koduka Y, Katoh H, Hirokawa Y, Inoue R, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infection within Warthin's tumor: report of two cases. **Pathol Int** 2001; 51(10): 797-801.

Wolinsky E. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculosis cases with long term follow-up. **Clin Infect Dis** 1995; 20: 954-963.

Yates MD, Pozniak A, Grange JM. Isolation of mycobacteria from patients seropositive for the Human Immunodeficiency Virus (HIV) in south east England: 1984-92. **Thorax** 1993; 48 (10): 990-995.

Yssel H, De Waal Malefyt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, *et al.* IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. **J Immunol** 1992; 149(7): 2378-2384.