

CRISTINA MARTINEZ ZUGAIB ABDALLA

**Avaliação crítica do uso da  
reação em cadeia da polimerase e  
exames complementares no  
diagnóstico da tuberculose cutânea  
e micobacteriose atípica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Dermatologia  
Orientadora: Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira

**São Paulo**

**2005**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Abdalla, Cristina Martinez Zugaib

**Avaliação crítica do uso da reação em cadeia da polimerase e exames complementares no diagnóstico da tuberculose cutânea e micobacteriose atípica /**  
Cristina Martinez Zugaib Abdalla. São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientadora: Zilda Najjar Prado de Oliveira.

Descritores: 1.REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE  
2.MYCOBACTERIUM 3.MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS  
4.TUBERCULOSE CUTÂNEA/diagnóstico 5.INCLUSÃO EM PARAFINA

USP/FM/SBD-329/05

## Dedicatória

---

Para **Beatrice, Ricardo, Archimedes e**  
**Licea**

## Agradecimientos

---

À minha orientadora, **Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira**, profissional exemplar, amiga e incentivadora, sem seu apoio, estímulo e confiança este estudo seria impossível.

Ao **Prof. Dr. Evandro A. Rivitti**, pelo seu apoio e incentivo, estímulo e confiança.

Aos **Doutores Kátia Ramos Moreira Leite e Luiz Heraldo Câmara Lopes**, meu agradecimento especial pelas orientações recebidas e pela disponibilidade do Laboratório de Patologia Cirúrgica do Hospital Sírio-Libanês.

À **Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto**, pelas sugestões e colaboração na elaboração desta tese.

Ao **Dr. Flávio Canellas Canavez**, pela colaboração e sugestão na realização do protocolo da PCR.

Ao **Dr. Guilherme Martins de Castro**, pelo incentivo e colaboração no envio de pacientes.

À **Dra. Helena Olegário da Costa**, grande amiga e estimuladora de meus projetos. Agradeço, também, pelo envio de pacientes.

À Sra. **Cláudia Muraro** e à Srta. **Ligia Maria Ichimura Fukumori**, meus agradecimentos pelo empenho na realização dos exames de PCR.

À Sra. **Dália Wajbrot**, meus agradecimentos pela contribuição e sugestões na análise estatística.

À Sra. **Rita Ortiz**, pela contribuição e empenho no levantamento da bibliografia e sua revisão.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptadas do International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)  
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.  
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise  
Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza  
Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e  
Documentação; 2004

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index  
Medicus

.

## Sumário

---



	página
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
LISTA DE QUADROS .....	xv
RESUMO .....	xvi
SUMMARY .....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	6
3.1 Micobactérias .....	12
3.2 Formas clínicas da tuberculose cutânea – PPD, exame histopatológico, pesquisa de BAAR e cultura .....	17
3.3 Micobacterioses atípicas .....	23
3.4 Exames subsidiários para diagnóstico da tuberculose cutânea e micobacteriose atípica .....	29
3.4.1 Exame anátomo-patológico .....	30
3.4.2 Pesquisa de BAAR .....	33
3.4.3 Imunohistoquímica .....	35
3.4.4 Cultura .....	35
3.4.5 Teste de tuberculina .....	37
3.4.6 Reação em cadeia de polimerase .....	40
4. MÉTODOS .....	53
4.1 Exame anátomo-patológico e coloração para BAAR .....	54
4.2 Critérios de inclusão e de exclusão .....	54
4.3 Exames .....	55
4.4 Padrão de referência .....	55
4.5 Avaliação da PCR e exames subsidiários .....	56
4.6 Exame anátomo-patológico e coloração para BAAR .....	56
4.7 Exame imunohistoquímico .....	57
4.8 PCR .....	58
4.9 Teste tuberculínico .....	63
4.10 Cultura .....	64
4.11 Estatística .....	67
5. RESULTADOS .....	70

5.1 Resultados dos exames anátomo-patológico, pesquisa para BAAR, imunohistoquímica, cultura, PPD, PCR, determinação da espécie, evolução clínica ou conclusão diagnóstica e presença de doenças associadas .....	71
5.2 Tabelas para análise estatística .....	85
6. DISCUSSÃO .....	89
7. CONCLUSÕES .....	109
8. REFERÊNCIAS .....	111

Listas

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

cc	centímetro cúbico
°C	grau Celsius
ed.	editores
µg	microgramas
µl	microlitros
ml	mililitro
mm	milímetros
prof.	professor
profa.	professora
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
”	segundos

## LISTA DE FIGURAS

		página
Figura 1	Leitura do algoritmo após PCR genérico para micobactérias com tratamento por enzimas de restrição.....	63
Figura 2	Tabela 2X2 .....	68
Figura 3	Fórmula para cálculo da sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia .....	69
Figura 4	Paciente número 15 .....	77
Figura 5	Paciente número 15 .....	77
Figura 6	Paciente número 16.....	78
Figura 7	Paciente número 25 .....	78
Figura 8	Paciente número 25 .....	79
Figura 9	Paciente número 25 .....	79
Figura 10	Paciente número 6 .....	80
Figura 11	Paciente número 31 .....	80
Figura 12	Paciente número 32 .....	81
Figura 13	Paciente número 32 .....	81
Figura 14	Resultado da PCR para detecção do género Mycobacteria .....	82
Figura 15	Identificação de <i>M. gordonae</i> ou <i>M.chelonae</i> ou <i>M. marinum</i> ou <i>M. terrae</i> por enzima de restrição .....	82
Figura 16	Identificação de <i>M. tuberculosis</i> por enzima de restrição .....	83
Figura 17	Identificação de <i>M. avium</i> por enzima de restrição .....	83
Figura 18	Identificação de <i>M. chelonae</i> por enzima de restrição ...	84
Figura 19	Micobactéria que não é identificada por meio de corte pelas enzimas de restrição .....	84

## LISTA DE TABELAS

		página
Tabela 1	Evolução clínica x PCR .....	85
Tabela 2	Evolução clínica x cultura .....	85
Tabela 3	Evolução clínica x imunohistoquímica .....	86
Tabela 4	Evolução clínica x PPD .....	86
Tabela 5	Evolução clínica x pesquisa de BAAR .....	86
Tabela 6	Evolução clínica x dermatite crônica granulomatosa ..	87
Tabela 7	Evolução clínica x dermatite crônica granulomatosa com necrosa caseosa .....	87
Tabela 8	Evolução clínica x dermatite crônica granulomatosa com PCR + / dermatite crônica granulomatosa com PCR .....	87
Tabela 9	Tabela geral de resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e concordância .....	88

## LISTA DE QUADROS

		página
Quadro 1	PPD, cultura, exame anátomo-patológico e pesquisa de BAAR na tuberculose cutânea por infecção exógena .....	22
Quadro 2	PPD, cultura, exame anátomo-patológico e pesquisa de BAAR na tuberculose cutânea por infecção endógena .....	22
Quadro 3	PPD, cultura, exame anátomo-patológico e pesquisa de BAAR nas tubercúlides .....	23
Quadro 4	Classificação das micobactérias segundo crescimento em cultura e patogenicidade .....	28
Quadro 5	Provas bioquímicas .....	66
Quadro 6	Resumo do quadro clínico, hipóteses diagnósticas clínicas,exame anátomo patológico, pesquisa de BAAR, imunohistoquímica, PPD, cultura, PCR, identificação da espécie, doença associada e evolução clínica .....	72

## Resumo

---



Abdalla CMZ. *Avaliação crítica do uso da reação em cadeia da polimerase e exames complementares no diagnóstico da tuberculose cutânea e micobacteriose atípica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2005. 119 p.

Os relatos de tuberculose cutânea aumentaram com o recrudescimento da tuberculose pulmonar e, paralelamente, houve aumento no número de descrições de infecção cutânea por micobactérias atípicas. Estas doenças apresentam aspecto clínico polimorfo e, muitas vezes, são de difícil diagnóstico. Foi realizado um estudo comparando a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia da reação em cadeia da polimerase à evolução clínica e painel de exames tradicionais para diagnóstico em pacientes com suspeita clínica de tuberculose cutânea e micobacteriose atípica. Para a identificação molecular da espécie de micobactéria, foram utilizados protocolos publicados na literatura que empregaram iniciadores genéricos que permitem a amplificação do gênero *Mycobacterium* e, com posterior tratamento com enzimas de restrição, a identificação da espécie de micobactéria. No estudo, foram incluídos doentes com suspeita clínica de tuberculose cutânea e micobacteriose atípica, as amostras que apresentaram a reação em cadeia da polimerase negativa para gene constitutivo de beta actina foram excluídas. Após a seleção de 220 blocos de parafina, foram incluídas 34 amostras de 32 doentes. A reação em cadeia da polimerase foi realizada em fragmento de pele de biópsia que era também submetida a exame anátomo-patológico, coloração para bacilo álcool-ácido-resistente e imunohistoquímica. Os resultados de cultura, teste tuberculínico e evolução clínica foram obtidos por meio de levantamento de prontuário. A evolução clínica foi usada como parâmetro para o diagnóstico final e como padrão de referência à análise estatística da reação em cadeia da polimerase e demais exames do painel. Observou-se sensibilidade da reação em cadeia da polimerase de 88%, especificidade de 83%, valor preditivo positivo de 82%, valor preditivo negativo de 88% e acurácia de 85% com concordância pelo teste de McNemar ( $p= 0,655$ ). Os exames do painel de maior acurácia, após a reação em cadeia da polimerase, foram o teste tuberculínico com acurácia de 79% e a presença de dermatite crônica granulomatosa com reação em cadeia da polimerase positiva com acurácia também de 79%, ambos com concordância pelo teste de McNemar ( $p= 0,179$  e  $p= 0,655$ , respectivamente). Os outros exames do painel, exceto o teste tuberculínico e a dermatite crônica granulomatosa com reação em cadeia da polimerase positiva, não apresentaram concordância quando comparados à evolução clínica.

Descritores: reação em cadeia da polimerase, *Mycobacterium*, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose cutânea/diagnóstico, inclusão em parafina

## Summary

---

Abdalla, CMZ. *The role of polymerase chain reaction and panel exams in the diagnosis of cutaneous tuberculosis and atypical mycobacteria skin infection compared to clinical evaluation* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2005. 119 p.

The reported cases of cutaneous tuberculosis have increased due to the recrudescence of pulmonary tuberculosis and, meanwhile, there has been a high in the reported numbers of atypical mycobacterial skin infection. These diseases present a polymorphic clinical aspect and, therefore, are usually difficult to diagnose. A study was performed comparing the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and the accuracy of the polymerase chain reaction and the traditional panel of exams for the diagnosis in patients with a clinical suspicion of cutaneous tuberculosis and atypical mycobacteria infection to the clinical evaluation. For the molecular identification of the Mycobacteria, protocols published in medical literature were applied, which used generic primers that allow the amplification of the Mycobacterium genus *and the species was identified by posterior treatment with restriction enzymes*. Patients with a clinical suspicion of cutaneous tuberculosis and atypical mycobacterial skin infection were included in the study. The samples that presented negative PCR for beta-actin gene were excluded. After the selection of 220 paraffin embedded tissues, 34 samples from 32 patients were included. The PCR was carried out in these specimens, which were also submitted to pathological examination, demonstration of acid-fast bacilli (AFB) by Fite- Faraco stain, and immunohistochemistry. The results from the culture, the tuberculin test and the clinical evaluation were obtained by collecting patients' records. The clinical evaluation was used as a parameter for the final diagnosis and as a reference standard for the statistical analysis of the PCR and the other exams of the panel. It was observed that the sensitivity of the PCR was 88%, the specificity was 83%, the positive predictive value was 82%, the negative predictive value was 88% and the accuracy was 85% in agreement with the McNemar test ( $p=0.655$ ). The panel exams of second highest accuracy, were the tuberculin test with an accuracy of 79% and the chronic granulomatous dermatitis with positive PCR, also with an accuracy of 79%, both in agreement with the McNemar test ( $p=0.179$  and  $p=0.655$ , respectively). The other exams of the panel, except for the tuberculin test and the chronic granulomatous dermatitis with positive PCR, did not present agreement when compared to the clinical evaluation.

Keywords: polymerase chain reaction, *Mycobacterium*, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis cutaneous/diagnosis, paraffin embedding

# 1. Introdução

---

A tuberculose continua sendo um dos principais problemas de saúde pública em grande número de países. Desde 1984, o número de casos publicados aumentou sensivelmente e, em paralelo, houve um aumento da incidência de tuberculose cutânea (Bollela et al., Barbagallo et al., 2003, Fenniche et al., 2003). O fator que mais contribuiu para esse crescimento foi o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) que favorece a reativação de um foco antigo ou a aquisição da doença, que pode se manifestar de forma atípica, retardando o diagnóstico, o que aumenta ainda mais sua transmissão.

A infecção causada pelas micobactérias atípicas é conhecida há mais de 50 anos e citada com frequência na literatura. Atualmente, em razão do desenvolvimento de métodos mais apurados de detecção e pela importância das micobactérias atípicas, como causadoras de doença em portadores de SIDA, transplantados e imunossuprimidos por drogas, o diagnóstico deste grupo de micobacterioses tem sido mais valorizado (Ferreira et al., 2002; Taippeiner, Wolf, 1993).

O quadro clínico da tuberculose cutânea e da infecção por micobactérias atípicas é polimorfo e merece o diagnóstico diferencial com outras doenças (Taippeiner, Wolf, 1993). A diagnose por meio do exame

anátomo-patológico, coloração para bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR), métodos de imunohistoquímica, teste tuberculínico e cultura são exames importantes para o diagnóstico diferencial. Observa-se, freqüentemente, em formas paucibacilares da doença que a pesquisa de BAAR, a imunohistoquímica e as culturas são negativas (Hsu et al., 1981; Wiley et al., 1991; Taippeiner, Wolf, 1993; Kox, 1995; Kutzner et al., 1998; Bollela et al., 1999; Ulukanligil et al., 2000; Ferreira et al., 2002).

Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular que permitem a amplificação de seqüência de ácido desoxirribonucleico (DNA)-alvo, veio contribuir, de modo significativo para a diagnose dos casos mais difíceis, além da vantagem de ser um método de alta sensibilidade, especificidade e rápida execução, mesmo quando os métodos de coloração, imunohistoquímica e cultura são negativos. (Cook et al., 1994; Telenti et al., 1993; Kox, 1995; Richter et al., 1995; Degitz, 1996; Roth et al., 1997; Chuang et al., 1997; Tan et al., 1999; Quiros et al., 2000; Ena et al., 2001; Tan et al., 2001; Ogusku et al., 2002; Senturk et al., 2002; Hsiao et al., 2003; Honoré-Boukaline et al., 2003).

Na prática dermatológica diária, sobretudo nos centros de referência e Hospitais Universitários, há com freqüência casos de suspeita diagnóstica de tuberculose cutânea e micobacterioses atípicas que, muitas vezes, não são elucidados. Não existe relato de estudo do uso da PCR para diagnóstico de tuberculose e micobacteriose atípica comparado ao quadro clínico, exame histológico, imunohistoquímica, cultura e teste tuberculínico.

## 2. Objetivos

---

Os objetivos deste estudo foram:

- avaliação do valor da PCR no diagnóstico da tuberculose cutânea e da infecção por micobactérias atípicas na pele, tendo como padrão de referência a evolução clínica
- comparar a PCR aos exames complementares: anátomo-patológico, coloração para BAAR, cultura e imunohistoquímica de lesão de pele e teste tuberculínico no diagnóstico da tuberculose cutânea e micobacteriose atípica



### 3. Revisão da literatura

---

A tuberculose é uma das doenças de maior importância na história da humanidade. Após a Segunda Guerra Mundial, houve declínio da incidência em razão do desenvolvimento de drogas que permitiam o tratamento curativo, melhora das condições de higiene e nutrição, porém, recentemente, percebeu-se recrudescimento da doença. Este aumento nos últimos anos se deve sobretudo ao empobrecimento das populações, migrações, à SIDA, resistência ao tratamento com a multidroga terapia e desestruturação dos serviços de saúde. (Degitz, 1996; Bollela et al., 1999; Tincopa-Wong, Morales, 1999; Ferreira et al., 2002; Ogusku et al., 2002; Barbagallo et al., 2003; Chaisson, Nachege, 2003).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde estima que 2 bilhões de pessoas, um terço da população mundial, está infectada pela *Mycobacterium tuberculosis* (Chaisson, Nachege, 2003). A tuberculose causa a morte de mais de 3 milhões de pessoas por ano no mundo e é considerada a segunda causa de mortalidade por doença infecciosa sendo a SIDA a primeira (Kox, 1995; Bollela et al., 1999). A cada ano, surgem oito milhões de novos casos, com prevalência global de 160 casos por 100.000 habitantes (American Thoracic Society, 2000). A doença é mais comum em países em desenvolvimento e cerca de 22 países são responsáveis por 80%

dos casos da doença. A tuberculose é mais freqüente em países com maior incidência de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Chaisson, Nachega, 2003).

Segundo a Secretaria de Vigilância do Ministério da Saúde, com dados atualizados em 2004, o Brasil está entre os 22 países de maior incidência da doença e, com o Peru, é responsável por 50% dos casos no continente americano. Por ano, são notificados cerca de 90 a 95 mil casos novos no Brasil; a prevalência da tuberculose no Brasil, segundo o informe de 2003 da Organização Mundial de Saúde, é de 64 casos por 100.000 habitantes.

A tuberculose cutânea também ressurgiu com o aparecimento da SIDA, com o recrudescimento da tuberculose pulmonar e a resistência a multidroga terapia (Fenniche et al., 2003; Barbagallo et al., 2003). Assim, o indivíduo infectado pela *M.tuberculosis* e pelo vírus do HIV tem risco 6 a 100 vezes maior de adoecer de tuberculose do que aquele que é infectado apenas com o *M. tuberculosis* (Bollela et al., 1999). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a tuberculose uma emergência global, e incentiva medidas de controle da doença em todo o mundo. Observa-se que sem mudança nas condições sócio-econômicas da população, o controle da tuberculose depende apenas do diagnóstico precoce e do tratamento efetivo, além de vacinação e quimioprofilaxia dos contactantes (Bollela et al., 1999).

As micobactérias atípicas são ambientais, porém apresentam potencial de colonização e causam infecção. Recentemente, o número de casos descritos de infecção por micobactéria atípica aumentou e está

associado a várias formas de imunossupressão, particularmente, à SIDA, que também é relatada em pacientes que aparentemente são imunocompetentes. Sua incidência não é conhecida em na sua totalidade, pois não é doença de notificação compulsória. Com base no relatório de vigilância realizada por alguns laboratórios nos Estados Unidos da América (EUA) a prevalência, nos anos de 1981 a 1983, foi estimada em 1.8 casos por 100.000 habitantes, com variação por regiões entre 6.8 casos por 100.000 habitantes em Oklahoma a 11.4 casos por 100.000 habitantes em Massachusetts (Taippeiner, Wolf, 1993; Ferreira et al., 2002; Heifets, 2004).

O quadro clínico depende da via ou modo de infecção e disseminação, da quantidade de bacilos (casos paucibacilares e multibacilares) e da forma clínica. A tuberculose e micobacterioses atípicas também podem apresentar quadros de hipersensibilidade que na pele são conhecidas como tubercúlides (Taippeiner, Wolf, 1993; Degitz, 1996; Margall et al., 1996; Roth et al., 1997; Baselga et al., 1997; Chuang et al., 1997; Senturk et al., 2002; Barbagallo et al., 2003).

A variabilidade de apresentações clínicas merece o diagnóstico diferencial com outras doenças (Sehgal et al., 1989; Taippeiner, Wolf, 1993; Margall et al., 1996; Gawkrödger, 1998; Barbagallo et al., 2003, Chaisson, Nachege, 2003).

A diagnose por meio do exame anátomo-patológico é, muitas vezes, prejudicada pela dificuldade de distinguir a tuberculose e micobacterioses atípicas de outros processos que desenvolvam dermatite granulomatosa ao exame da pele (Sehgal et al., 1989; Taippeiner, Wolf, 1993; Degitz, 1996;

Margall et al., 1996; Rabinowitz, Zaim, 1996; Gawkrödger, 1998). Assim, o diagnóstico dessas afecções é um desafio e requer, além da correlação clínico-patológica, outros exames laboratoriais (Rabinowitz, Zaim, 1996). Nesta situação, a coloração específica para bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR), métodos de imunohistoquímica e teste tuberculínico são exames importantes para o diagnóstico diferencial. Com frequência observa-se em formas paucibacilares da doença, que a pesquisa de BAAR, a imunohistoquímica e as culturas são negativas (Hsu et al., 1981; Wiley et al., 1991; Taippeiner, Wolf, 1993; Kox, 1995; Kutzner et al., 1998; Bollela et al., 1999; Ulukanligil et al., 2000; Ferreira et al., 2002).

A cultura é considerada padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose, porém é um método demorado (cerca de 4 a 8 semanas) (Bollela et al., 1999; Senturk et al., 2002). Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular permite a amplificação de seqüência de ácido desoxirribonucleico (DNA)-alvo, veio contribuir, significativamente, para a diagnose desses casos mais difíceis, além da vantagem de ser um método de alta sensibilidade, especificidade e rápida execução (Cook et al., 1994; Telenti et al., 1993; Kox, 1995; Richter et al., 1995; Degitz, 1996; Roth et al., 1997; Chuang et al., 1997; Tan et al., 1999; Quiros et al., 2000; Tan et al., 2001; Ena et al., 2001; Ogusku et al., 2002; Senturk et al., 2002; Hsiao et al., 2003; Honore-Boukhaline et al., 2003).

Na literatura, encontram-se vários relatos, em especial, com o uso de PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico da tuberculose e outras micobacterioses atípicas (Telenti et al., 1993; Cook et al., 1994; Kox,

1995; Richter et al., 1995; Degitz, 1996; Chuang et al., 1997; Roth et al., 1997; Tan et al., 1999; Quiros et al., 2000; Tan et al., 2001; Ena et al., 2001; Ogusku et al., 2002; Senturk et al., 2002; Hsiao et al., 2003; Honoré-Boukaline et al., 2003). A vantagem do método é que, por meio da amplificação da seqüência-alvo, detecta-se a presença de parte do gene da micobactéria, possibilitando o diagnóstico, mesmo quando os métodos de coloração, imunohistoquímica e cultura são negativos. Não há relatos em nosso meio de uso da PCR para diagnóstico de tuberculose e micobacteriose atípica comparada a quadro clínico, exame histológico, imunohistoquímica, cultura e teste tuberculínico.

Na prática dermatológica diária, sobretudo, em centros de referência e Hospitais Universitários, há com freqüência casos de suspeita diagnóstica de tuberculose cutânea e micobacterioses atípicas que muitas vezes não são elucidados. O uso de métodos diagnósticos pelas técnicas de biologia molecular, como a PCR pode ser de grande ajuda na elucidação diagnóstica dessas doenças, em razão de sua maior sensibilidade.

### 3.1 Micobactérias

As bactérias do gênero *Mycobacterium* pertencem à família Mycobacteriaceae e à ordem Actinomycetales. Estão amplamente distribuídas na natureza com um espectro variável, desde habitantes naturais da água e do solo, até agentes patogênicos obrigatórios (Taippeiner, Wolf, 1993; Kox, 1995). A família Mycobacteriaceae apresenta apenas o gênero *Mycobacterium* que inclui o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. bovis* BCG e *M. canetti*), a *M. leprae* e as micobactérias atípicas (Taippeiner, Wolf, 1993; Kox, 1995; Sampaio, Rivitti, 2001).

*Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* são consideradas patógenos obrigatórios e causadoras respectivamente da tuberculose e da hanseníase (Taippeiner, Wolf, 1993). A transmissão verifica-se de indivíduo para indivíduo. Embora a tuberculose seja uma doença disseminada, a micobactéria é pouco virulenta. Aproximadamente, cinco a dez por cento das infecções por *Mycobacterium tuberculosis* causam doença (Taippeiner, Wolf, 1993).

As micobactérias atípicas são patógenos facultativos, podem colonizar e ocasionalmente determinar doença no homem (Taippeiner, Wolf, 1993). As micobactérias mais conhecidas desse grupo são *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (MAIS), *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. Há ainda as micobactérias não

patógenas como *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. flavescens* e complexo *M. terrae* (Taippeiner, Wolf, 1993). Estas bactérias são conhecidas como micobactérias atípicas, oportunistas, ambientais ou “outras micobactérias que não da tuberculose” da língua inglesa “Mycobacterium Other Than Tuberculosis” (MOTT). Em 1979, foram denominadas por alguns autores como “paratuberculose”, mas atípica é a designação de uso corrente (Palenque, 2000; Sampaio, Rivitti, 2001; Chemal, Portales, 2003; Ramos-e-Silva, Castro, 2003; Heifets, 2004).

As micobactérias são aeróbicas, bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR), gram-positivas e não formam esporos. Uma característica importante do gênero é a presença de parede celular espessa, hidrofóbica e rica em lipídios, ácido micólico e micolatos (Taippeiner, Wolf, 1993; Heifets, 2004).

O complexo *M. tuberculosis* compreende um grupo de microrganismos de crescimento lento com 20 a 24 horas para divisão celular. Além disso, a *M. tuberculosis* é capaz de persistir de forma latente nas células e granulomas por anos e pode ser reativada causando doença após décadas (Heifets, 2004). Estas características biológicas próprias da micobactéria contribuem para a dificuldade no diagnóstico e combate à doença (Chaisson, Nachege, 2003; Heifets, 2004).

Seu crescimento em cultura pode ser lento ou rápido, assim, as de crescimento lento são ainda subdivididas, de acordo com sua capacidade de produção de pigmento na cultura em fotocromógenas (produzem pigmento com exposição à luz), escotocromógenas (produzem pigmento com ou sem



exposição à luz) e não cromógenas (não produzem pigmento com exposição à luz) (Taippeiner, Wolf, 1993).

Atualmente sessenta 60 espécies são reconhecidas (Taippeiner, Wolf, 1993), mas novas espécies continuam a ser identificadas, sobretudo, após a adoção dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos. (Taippeiner, Wolf, 1993; Roth et al., 1997, Pauls et al., 2003). Algumas espécies como *M. leprae* e *M. genavense* não são cultiváveis (Taippeiner, Wolf, 1993).

O estabelecimento da doença tuberculose ou micobacteriose atípica depende da susceptibilidade individual para a infecção frente ao agente. A resposta tecidual e imune do hospedeiro exerce um papel decisivo na determinação do tipo e extensão da doença causada pela micobactéria (Taippeiner, Wolf, 1993; Senturk et al., 2002).

A micobactéria parece ser tão antiga quanto a raça humana. Achados pré-históricos indicam a presença de infecção pela micobactéria no homem. Na Antigüidade, a infecção era conhecida como “phithisis”. Na Palestina, na época de Cristo, a tuberculose era denominada de lupus vulgar. Nos séculos XVII e XVIII, a doença já era sabida por atingir diversos órgãos.

No século XIX, a tuberculose era considerada problema de saúde pública e acometia indivíduos de vários segmentos da sociedade. O compositor Frederic Chopin e o patologista René Laennec morreram da doença. Em 1826, Laennec fez o primeiro relato de úlceras por tuberculose cutânea em patologistas que faziam autópsias em indivíduos falecidos de tuberculose (Degitz, 1996; Ogusku et al., 2002). Em 1865, Jean Antoine

Villemin descreveu que a transmissão da doença era por contato de indivíduo a indivíduo (Tincopa-Wong, Morales, 1999).

As bases histopatológicas da tuberculose foram relatadas, inicialmente, no começo do século XIX por Bayle que descreveu o tubérculo miliar até a caseificação. Em 1855, Foster descreveu em exames anátomo-patológicos de lupus vulgar, as células gigantes epitelióides que, em 1888, foram confirmadas por Langerhans (Degitz, 1996; Tincopa-Wong, Morales, 1999). Em 1869, Hardey descreveu a tuberculose verrucosa cutânea. Em 1876, Friedlander, por meio das bases histopatológicas citadas, estabeleceu uma relação estreita entre lupus vulgar, escrofuloderma e tuberculose, considerando-as como formas cutâneas da tuberculose (Tincopa-Wong, Morales, 1999). Em 1882, Robert Koch identificou o bacilo da tuberculose e, em 1896, Darier descreveu vários quadros clínicos como tubercúlides, doenças relacionadas com a tuberculose. Na ocasião, descreveu o líquen escrofuloso, a tubercúlide pápulo-necrótica e o eritema indurado, que já havia sido descrito por Bazin em 1861. O lupus vulgar e o escrofuloderma eram doenças freqüentes e mutiladoras, consideradas incuráveis e, muitas vezes tratadas com cauterização química ou fulguração (Degitz, 1996).

No período entre 1885 e 1891, Robert Koch e seus colaboradores desenvolveram a tuberculina com a função de transferência de imunidade com o objetivo de tratar a doença. A inoculação da tuberculina não modificou a evolução natural da tuberculose (Beutner, 1997). Posteriormente, os dermatologistas da época desenvolveram unguento de tuberculina para tratamento de lupus vulgar (Beutner, 1997).

Em 1903, Niels Finsen ganhou o prêmio Nobel com a introdução do tratamento com ultravioleta para tuberculose cutânea (Degitz, 1996).

Em 1910, Mantoux introduziu o teste tuberculínico subcutâneo. Só após a Segunda Guerra Mundial, surgiu um teste tuberculínico com proteína purificada como nos moldes atuais para avaliação de infecção pelo *M. tuberculosis* (Beutner, 1997).

Calmette e Guérin desenvolveram o bacilo bovino atenuado (BCG) no Instituto Pasteur, na época da Primeira Guerra Mundial, com o objetivo de imunizar a população. Os países escandinavos foram os primeiros a receberem a vacina contra tuberculose. A imunização com BCG era realizada em indivíduos com teste tuberculínico negativo. Em 1940, iniciou-se o tratamento da tuberculose com drogas tuberculostáticas (Beutner, 1997).

Nos anos de 1950, o centro de controle de doenças (CDC) americano recomendava que o diagnóstico da tuberculose deveria ser estabelecido em pacientes com PPD positivo, uma vez que a doença estava em franco declínio e que as drogas eram efetivas no tratamento (Beutner, 1997). No entanto, muitos países com alta incidência de tuberculose praticavam a vacinação universal como medida de controle, impossibilitando o uso da intradermoreção com a proteína purificada derivada da tuberculina (PPD) para diagnóstico (Beutner, 1997).

A partir da década de 1980, com a disseminação da infecção pelo vírus HIV e a deteriorização dos programas de controle da doença, a

tuberculose tornou a ser importante questão de saúde pública (Bollela et al., 1999). Com o recrudescimento da tuberculose pulmonar, a forma cutânea da doença também aumentou de freqüência.

Segundo Feniche et al., a prevalência da tuberculose cutânea é de 2,1% . Estima-se que 0,1% dos pacientes com doenças dermatológicas na Índia, apresentem tuberculose cutânea (Sehgal et al., 1989; Barbagallo et al., 2003). Em estudo retrospectivo de dez anos (1983-1992), realizado em Hong Kong, a tuberculose cutânea representou 0,066% de todos os casos novos dermatológicos, comparados a 0,4% na década anterior. Na Europa, a prevalência é de 0,5% (Chong, Lo, 1995).

### **3.2 Formas clínicas da tuberculose cutânea - PPD, exame anátomo-patológico, pesquisa de BAAR e cultura**

A tuberculose cutânea pode ser adquirida por meio da via endógena ou exógena, apresentando vários aspectos clínicos e anátomo-patológicos (Tappeiner, Wolf, 1993; Margall et al., 1996; Rabinowitz, Zaim, 1996; Senturk et al., 2002). Sua classificação é complexa; atualmente, consideram-se os critérios clínicos, associados à rota de infecção, de acordo com o proposto por Tappeiner e Wolff e imunidade do paciente (Tappeiner, Wolf, 1993; Barbagallo et al., 2003). A infecção exógena ocorre pela inoculação direta em indivíduo susceptível. A endógena, em indivíduo previamente

infectado, tanto por contigüidade como por disseminação hematogênica ou linfática (Barbagallo et al., 2003). Embora este sistema seja interessante para entendimento dos vários tipos de tuberculose, formas como lupus vulgar podem ser classificadas em endógenas, mas, raramente, em exógenas (Taippeiner, Wolf, 1993; Barbagallo et al., 2003).

As tubercúlides são formas de hipersensibilidade a antígenos do bacilo e, assim como a tuberculose cutânea apresentam vários padrões (Barbagallo et al., 2003). Caracterizam-se por haver foco de tuberculose a distância e lesões cutâneas onde o bacilo ou não é ou raramente é identificado por coloração específica, cultura ou PCR (Taippeiner, Wolf, 1993, Faizal et al., 1996).

Formas clínicas:

1. Infecção exógena:

1.1 cancro primário - resulta da inoculação direta da micobactéria na pele em hospedeiro não previamente infectado. O cancro tuberculoso afeta os linfonodos regionais dando origem ao complexo primário na pele. O quadro clínico consiste em lesões pápulo-nodulares ulcerativas e adenopatia .

1.2 tuberculose verrucosa - ocorre por inoculação exógena do bacilo na pele em indivíduo previamente sensibilizado. A lesão inicial é uma pápulo-pústula que evolui para lesão verrucosa.

## 2. Infecção endógena:

2.1 lupus vulgar – é a forma secundária de tuberculose em indivíduos tuberculino-positivos e com moderada imunidade ao bacilo. Origina-se de foco tuberculoso pulmonar ou adenite cervical por disseminação hematogênica, linfática ou por contigüidade. A lesão inicial é mácula, pápula ou nódulo de consistência amolecida que coalesceu, resultando placas infiltradas circulares ou giratas com atrofia ou ulceração central. Pela vitropressão, obtém-se a cor amarelada de geléia de maçã.

2.2 escrofuloderma - é a forma mais comum de tuberculose em nosso meio, é caracterizada por linfonodos que fistulizam e ulceram com eliminação de material caseoso. Resulta da propagação para a pele de tuberculose dos linfonodos.

2.3 tuberculose miliar aguda – forma rara e causada pela disseminação hematogênica da micobactéria. O foco inicial da tuberculose pode ser no pulmão ou na meninge. Geralmente, não há sensibilização prévia; apresenta-se como pápulas disseminadas.

2.4 tuberculose orificial – ocorre por auto-inoculação da micobactéria proveniente de tuberculose em algum órgão interno. Surge após trauma; pode ocorrer na boca, ânus,

orifício da uretra e vulva. Clinicamente, apresenta-se com nódulo que evolui para ulceração.

2.5 tuberculose gomosa – ocorre por disseminação hematogênica de foco a distância. É mais comum em crianças desnutridas e em doentes com imunossupressão. Observam-se nódulos subcutâneos com secreção.

### 3. Tubercúlides

3.1 líquen escrofuloso ou tubercúlide liquenóide – erupção liquenóide, geralmente, em crianças ou adolescentes com tuberculose.

3.2 tubercúlide pápulo-necrótica – erupção simétrica com pápulas com depressão central e crosta aderente.

3.3 eritema indurado de Bazin – geralmente, afeta pacientes do sexo feminino. Nódulos eritrocianóticos endurecidos, em geral ulcerados, recorrentes, localizados nas pernas.

3.4 eritema nodoso – nódulos eritematosos decorrentes de paniculite. Pode ser reacional a vários antígenos, inclusive da micobactéria.

4. Tuberculose causada pela vacinação por BCG - a evolução natural, após a vacinação com BCG, é a formação de pápula que ulcera e regride lentamente, deixando cicatriz, com ou sem aumento dos linfonodos regionais que, normalmente, apresentam regressão. Mas, eventualmente, foram descritos quadros semelhante à infecção por micobactéria, com lesões

análogas ao lupus vulgar no local de inoculação, fenômeno de Koch (linfadenite regional), abscesso subcutâneo, aspecto semelhante ao escrofuloderma persistente por seis a 12 meses, quadro similar à tuberculose, osteíte ou apresentações clínicas análogas à tuberculose em órgãos distantes.

Os achados mais freqüentes do teste tuberculínico (PPD), cultura e exame anátomo-patológico estão resumidos nos Quadros 1, 2 e 3.



**Quadro 1-** PPD, cultura, exame anátomo-patológico e pesquisa de BAAR na tuberculose cutânea por infecção exógena

<b>doença</b>	<b>PPD</b>	<b>Cultura</b>	<b>Anátomo-patológico</b>
cancro tuberculoso	+/-	+	Reação inflamatória aguda, granuloma, BAAR++
tuberculose verrucosa	+	+/-	Granuloma tuberculóide, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, BAAR +/-
lupus vulgar (alguns casos)	+	+/-	Granuloma tuberculóide, BAAR +/-

++ : fortemente positivo, + : positivo, +/-: positivo ou negativo, -: negativo

Fonte: Barbagallo, J, Tager, P, Ingleton, R, Hirsch, J, Weinberg, M. Cutaneous tuberculosis. Diagnostic and treatment. Am J Clin Dermatol, 2003;3(5):319-28.

**Quadro 2** - PPD, cultura, exame anátomo-patológico e pesquisa de BAAR na tuberculose cutânea por infecção endógena

<b>doença</b>	<b>PPD</b>	<b>Cultura</b>	<b>Anátomo-patológico</b>
lupus vulgar (alguns casos)	+	+/-	Granuloma tuberculóide, BAAR +/-
escrofuloderma	+	+	Necrose, abscesso, BAAR +
tuberculose miliar	+/-	+	Microabscessos , BAAR++
tuberculose orificial	+/-	+	Granuloma tuberculóide, BAAR + +
tuberculose gomosa	+/-	+	Necrose, abscesso, BAAR++

++ : fortemente positivo, + : positivo, +/-: positivo ou negativo, -: negativo

Fonte: Barbagallo, J, Tager, P, Ingleton, R, Hirsch, J, Weinberg, M. Cutaneous tuberculosis. Diagnostic and treatment. Am J Clin Dermatol, 2003;3(5):319-28.

**Quadro 3** - PPD, cultura, exame anátomo-patológico e pesquisa de BAAR nas tuberculídes

doença	PPD	Cultura	Anátomo-patológico
líquen escrofuloso	+	-	Granuloma tuberculóide, BAAR -
eritema indurado de Bazin	+/-	-	Granuloma tuberculóide, paniculite lobular, BAAR -
tuberculíde pápulo necrótica	+	-	Áreas de necrose, BAAR -

++ : fortemente positivo, + : positivo, +/-: positivo ou negativo, -: negativo

Fonte: Barbagallo, J, Tager, P, Ingleton, R, Hirsch, J, Weinberg, M. Cutaneous tuberculosis. Diagnostic and treatment. Am J Clin Dermatol, 2003;3(5):319-28.

### 3.3 Micobacterioses atípicas

As micobactérias atípicas são um grupo de micobactérias diferentes da tuberculose e da hanseníase; o nome micobactérias atípicas foi atribuído, porque se acreditava que seriam cepas variantes da *M. tuberculosis* (Palenque, 2000).

A manifestação clínica da infecção é variada. As lesões cutâneas ocorrem no local de inoculação do bacilo na pele, após trauma ou disseminação hematogênica; podem ser papulosas, nodulares, úlcero-crostosas, necróticas, supurativas, coalescentes e gomosas. Alguns pacientes apresentam lesões dispostas em rosário, semelhante a esporotricose (Heifets, 2004). Existe descrição de tuberculíde do tipo

liquenóide em pacientes com micobacteriose atípica causada pela *M. avium* (Komatsu et al., 1999).

A primeira descrição de micobacteriose atípica ocorreu em 1926 em nadadores, sendo isolada pela primeira vez, em 1951, como *M. marinum* (Taippeiner, Wolf, 1993). As lesões ocorrem em nadadores, pescadores e pessoas que colecionam peixes ou que cuidam de aquários, daí o nome granuloma das piscinas ou dos pescadores.

O quadro anátomo-patológico mostra processo inflamatório com supuração na fase aguda e, tardiamente, apresenta poucos granulomas sem caseose. Pode ainda ocorrer ulceração, acantose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Os BAAR são raramente visualizados (Taippeiner, Wolf, 1993; Heifets, 2004).

Posteriormente, diversas micobactérias foram descritas, produzindo várias apresentações clínicas, como a *M. fortuitum*, isolada por Da Costa, e a *M. chelonae*, isolada de abscesso pós-injeções e trauma. Mais tarde, as micobactérias foram associadas a *M. abscessus*, *M. mucogenicum* e *M. peregrinum* e agrupadas no complexo *M. fortuitum*, por apresentarem características fenotípicas semelhantes (Palenque, 2000; Satta et al., 2002; Chermal, Portaels, 2003; Aziz et al., 2004; Heifets, 2004).

Estas micobactérias estão amplamente distribuídas na natureza e são encontradas em escarro e saliva de indivíduos sãos. Em uma série de 100 amostras onde o *M. chelonae* foi isolado, 53% eram provenientes de infecção cutânea, 35% de osteomielite e 12% de infecção por cateter.

Podem também causar pneumonia, endocardite, linfadenopatia, osteomielite e morte por infecção generalizada em pacientes com imunossupressão. As lesões cutâneas ocasionadas por essas micobactérias são indolentes e não respondem aos antimicrobianos de rotina. O exame anátomo-patológico mostra poucos granulomas tuberculóides, processo inflamatório inespecífico, atingindo derme e hipoderme com supuração. Os BAAR são escassos e a cultura é a melhor forma de identificação do agente. O teste “in vitro” de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos é necessário, pois todas as cepas apresentam resistência ao tratamento clássico para tuberculose (Palenque, 2000; Chemal, Portaels, 2003; Aziz et al., 2004; Heifts, 2004).

As doenças causadas por micobactérias atípicas são esporádicas, porém em certas comunidades e, dependendo do tipo de exposição, podem ser endêmicas, como a infecção por *M. ulcerans* que é uma doença comum na Austrália e em Buruli (Uganda), onde é chamada de úlcera de Buruli (Taippeiner, Wolf, 1993).

O exame anátomo-patológico mostra necrose central da hipoderme, circundada por granuloma com células gigantes sem caseose típica ou tubérculo. Os bacilos são visualizados com facilidade pela coloração de BAAR e, raramente, são recuperados em cultura (Palenque, 2000; Chemal, Portaels, 2003; Aziz et al., 2004; Heifts, 2004).

Estados que levam à imunossupressão como a SIDA, transplante, uso de drogas imunossupressoras, podem facilitar a infecção e apresentação de formas pulmonares, ganglionares, ósseas e disseminadas, causadas, sobretudo, pelo *M. avium intracellulare-scrofulaceum* (MAIS). Os

membros desse complexo apresentam natureza variável, podendo ser isolados da água, solo, plantas, poeira doméstica e alimento. Usualmente, a infecção ocorre por meio do trato gastrintestinal ou respiratório. Os organismos são de baixa patogenicidade e são encontrados colonizando indivíduos que não apresentam doença (Chemal, Portaels, 2003; Aziz et al., 2004; Heifts, 2004).

Entretanto, as infecções causadas por estas micobactérias são importantes, especialmente, em associação com a SIDA (Chemal, Portaels, 2003; Aziz et al., 2004; Heifts, 2004). Em pacientes imunocompetentes, a doença é de modo usual pulmonar, semelhante à tuberculose, porém pode apresentar forma exclusivamente cutânea (Satta et al., 1999). O diagnóstico é firmado pelo quadro clínico, histológico, cultura (crescimento lento a 37<sup>0</sup>C) e PCR.

A *M. kansasii* induz também uma série de apresentações clínicas. É, filogeneticamente, próxima às micobactérias não patogênicas, de crescimento lento, com pigmentação amarela, quando a colônia é submetida à luz. Está relacionada com SIDA e em transplantados (Chemal, Portaels, 2003; Aziz et al., 2004; Heifts, 2004).

A *M. hemophilum* infecta indivíduos com SIDA (uma das infecções mais freqüentes). Cresce em cultura com presença de hemoglobina a cerca de 30 a 32<sup>0</sup>C (Chemal, Portaels, 2003; Aziz et al., 2004; Heifts, 2004).

Há um grupo de micobactérias, não relacionadas, que podem infectar a pele; basicamente, são oportunistas na SIDA e podem também afetar a

pele por disseminação hematogênica, sendo espécies de crescimento lento, de mais de seis semanas: *M. simiae*, *M. malmoense*, *M. smegmatis*, *M. gordonae* e *M. szulgai* (Chemal, Portaels, 2003; Aziz et al., 2004; Heifts, 2004).

**Quadro 4 -** Classificação das micobactérias, segundo crescimento em cultura e patogenicidade

**Micobactérias de crescimento lento**

- Patógenos humanos obrigatórios  
Grupo *M. tuberculosis-bovis*, bacilo de Calmette-Guérin (BCG) e *M. africanum*
- Patógenos humanos facultativos  
*M. kansasii*  
*M. marinum*  
*M. simiae*  
*M. scrofulaceum*  
*M. szulgai*  
*M. gordonae*  
*M. avium-intracellulare complex*  
*M. haemophilum*  
*M. ulcerans*  
*M. xenopi*
- Não patógenos  
*M. flavescens*  
*M. terrae complex*  
*M. triviale*  
*M. gastri*

**Micobactérias de crescimento rápido**

- Patógenos humanos facultativos  
*M. fortuitum*  
*M. chelonae*  
*M. abscessus*
- Não patógenos  
*M. smegmatis*  
*M. phlei*  
*M. vaccae*

Fonte: Taippeiner G, Wolff K. Tuberculosis and other mycobacterial infections. In: Fitzpatrick T B, Eisen A Z, Wolff K, editores. Dermatology in general medicine. New York: McGraw-Hill; 1993. p.1933-50.

### **3.4 Exames subsidiários para diagnóstico da tuberculose cutânea e de micobacteriose atípica**

O diagnóstico da tuberculose cutânea e micobacterioses atípicas é ainda difícil (Kox, 1995; Roth et al., 1997; Degitz; Senturk et al., 2002). Para a detecção pela coloração para BAAR, a presença de muitos bacilos é necessária, e muitas formas da doença são paucibacilares com presença de poucos ou ausência de bacilos (Kox, 1995; Degitz, 1996; Roth et al., 1997; Sampaio, Rivitti, 2001; Ogusku et al., 2002; Senturk et al., 2002).

A intradermoreação, baseada na reatividade à tuberculina, não distingue doença ativa de prévia. A cultura é o exame mais importante para diagnóstico, porém a espera pelo resultado é longa e a positividade não é expressiva. A radiometria diminuiu o tempo esperado para resultado de cultura, porém ainda é um método caro e exige material específico (Kox, 1995).

A partir dos anos de 1960, com o início dos métodos de biologia molecular para o diagnóstico, novas técnicas foram introduzidas como análise por enzima de restrição, “Southern-blot” e hibridização “in situ”. O método de hibridização é satisfatório para culturas, pois milhões de cópias de DNA-alvo da micobactéria podem estar presentes. Esta análise fica prejudicada em amostras clínicas que, muitas vezes, contêm poucas cópias do genoma. A baixa sensibilidade do método foi compensada com a introdução da PCR. Esta reação permite a amplificação da seqüência-alvo da micobactéria, facilitando e acelerando o diagnóstico de tuberculose e das



micobacterioses atípicas. Em poucas horas, pode-se obter o diagnóstico e instituir a terapêutica (Bollela et al., 1999). Na literatura, existem vários trabalhos que demonstram a detecção de micobactérias por PCR é comparável e, muitas vezes, superior à cultura que é padrão-ouro no diagnóstico de tuberculose e micobacterioses (Kox, 1995; Roth et al., 1997; Bollela, et al., 1999; Ogusku et al., 2002).

Métodos para diagnóstico sorológico para detecção de anticorpos contra o complexo *M. tuberculosis* por ELISA não são utilizados de rotina. A sensibilidade e especificidade dependem do antígeno empregado, porém a maioria dos estudos mostra baixa sensibilidade. A exposição às micobactérias do meio ambiente e a vacinação por BCG alteram o resultado (Lodha, Kabra, 2004).

### **3.4.1 Exame anátomo-patológico**

O início da infecção caracteriza-se por um processo inflamatório não específico. A reação do tipo granulomatosa aparece após três a seis semanas do início do processo inflamatório. Nesse momento, os bacilos são raros, porém crescem em cultura.

O granuloma bem formado consiste em foco de células epitelióides, contendo células de Langherans em número variável, envoltas por infiltrado de células mononucleares. O centro do granuloma pode evoluir para necrose caseosa e calcificação. Alterações endovasculares e perivasculares periféricas podem estar presentes com necrose e até fibrose. Os granulomas

variam em sua apresentação, dependendo do fator predominante. A presença de bacilos na lesão está ligada ao estado imunológico do hospedeiro (Taippeiner, Wolf, 1993, Tincopa-Wong, Morales, 1999, Barbagallo et al., 2003).

Os granulomas podem ser classificados em dois grandes grupos (com vasculite e sem vasculite). O granuloma envolvido na tuberculose e micobacteriose atípica pode ser classificado em granuloma sem vasculite (exceto nos casos de eritema indurado de Bazin), do tipo sarcoídico (nu), necrotizante (alguns com necrose caseosa) e supurativo (Rabinowitz, Zaim, 1996).

As diferenças histopatológicas dependem também de balanço entre infecção e resposta imune. No granuloma da tuberculose, uma reação neutrofílica aguda é seguida por infiltrado mononuclear que em três a seis semanas transforma-se em granuloma, cujos bacilos são raramente observados. Nas formas orificial e miliar, o granuloma pode não se formar, formar-se parcialmente ou apresentar necrose. Os bacilos podem ser observados nessa situação.

No escrofuloderma, a pele é destruída por formação de abscesso inespecífico e ulceração. O granuloma e a necrose caseosa formam-se na periferia da lesão. Na tuberculose verrucosa a formação clássica do granuloma não é observada, dando lugar à hiperplasia pseudo-epiteliomatosa. Os bacilos são raros, e a formação de granuloma e a caseificação são ainda mais raras.

O lupus vulgar pode se apresentar como granuloma, porém alterações semelhantes à tuberculose verrucosa podem ser observadas. A caseificação é esparsa e rara e os bacilos são raramente demonstrados. Com a cicatrização, aparece a fibrose, com persistência de pequenos focos de granuloma e bacilos (Taippeiner, Wolf, 1993; Rabinowitz, Zaim, 1996; Gawkrödger, 1998).

A presença de bacilos no granuloma é rara. A doença pode se apresentar com os elementos característicos, porém as variações de apresentação levam ao diagnóstico diferencial de várias outras doenças, especialmente, se a necrose de caseificação não estiver presente e o hospedeiro tiver imunidade comprometida (Taippeiner, Wolf, 1993; Rabinowitz, Zaim, 1996; Gawkrödger, 1998).

O padrão histológico de dermatite granulomatosa ocorre em várias doenças e, por outro lado, a tuberculose pode apresentar diversos aspectos histológicos (Taippeiner, Wolf, 1993; Rabinowitz, Zaim, 1996; Gawkrödger, 1998).

A diferenciação entre as lesões causadas pelas diversas micobactérias é impossível sem a realização da cultura ou de PCR. Diferenciar da sarcoidose também é uma tarefa difícil, sobretudo no lupus vulgar.

Na hanseníase do tipo tuberculóide, o único componente de distinção é o infiltrado perineural e neural. A leishmaniose, paracoccidioidomicose e cromomicose também podem se apresentar como granuloma ao exame

anátomo-patológico, porém a pesquisa do agente etiológico é mais positiva que na tuberculose.

A sífilis terciária apresenta também formação de granulomas, porém as alterações vasculares são mais pronunciadas e ainda podem mostrar infiltrado de células plasmocitárias (semelhantes à leishmaniose).

Além das doenças infecciosas, a rosácea e a paniculite também podem apresentar aspecto granulomatoso (Taippeiner, Wolf, 1993; Gawkrodger, 1998; Rabinowitz, Zaim, 1996).

#### **3.4.2 Pesquisa de BAAR**

A identificação de BAAR pode ser realizada por meio da propriedade de coloração da parede da micobactéria, que é rica em lipídios, pela carbofucsina. A técnica mais conhecida é a de Ziehl-Neelsen, porém existem outras variações da técnica padronizada como Fite-Faraco, técnicas de imunofluorescência, como a de Kinyoun ou através de fluorocromos como a rodamina e auramina (Kox, 1995).

O limite de detecção é de 5.000 - 10.000 bactérias/ml (Kox, 1995; Bolella et al., 1999). A sensibilidade varia de acordo com a amostra e a micobactéria envolvida. Os melhores resultados são obtidos com amostras do trato respiratório nos quais a sensibilidade é de 22%-78% e a especificidade é de 100% (Kox, 1995; Ogusku et al., 2002).

Como a concentração de micobactérias é baixa na tuberculose cutânea, o método de coloração é um exame de baixa sensibilidade (Ogusku

et al., 2002). Por outro lado, o exame histológico de lesões fixadas em formol e emblocadas em parafina freqüentemente não detecta a presença de bacilos ou estes são encontrados em pouca quantidade, o que determinou numerosas modificações da técnica clássica de Ziehl-Neelsen (Ulukanligil et al., 2000).

Perez e colaboradores relatam que a técnica de Fite-Faraco é superior a de Ziehl-Neelsen quando comparada no mesmo fragmento (Perez et al., 1963). Fukunaka e colaboradores demonstraram a diferença entre o material “a fresco” e fixado. Cogitaram que os solventes orgânicos usados para a preparação da parafina pudessem interferir na capacidade de coloração da parede da micobactéria (Fukunaga et al., 2002).

Quando a sensibilidade da coloração é comparada ao PCR quantitativo, a estimativa é que a presença de bacilos seja  $10^3$  a  $10^9$  vezes maior. A explicação é que a PCR não detecta apenas o DNA dos bacilos vivos, mas também bacilos mortos depositados no estroma ou nas células fagocitárias (Fukunaga et al., 2002). Este estudo sugere que a PCR pode ser muito sensível, porém não distingue bacilos ativos de inativos (Fukunaga et al., 2002).

Como o exame microscópico não pode identificar o tipo de micobactéria e, com freqüência, a presença da micobactéria é subestimada em razão de problemas técnicos, a realização de cultura torna-se necessária (Kox, 1995).

### 3.4.3 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é um método para se avaliar a presença de microrganismos aos cortes histológicos, no qual se detecta a presença de antígenos celulares do agente infectante por meio de anticorpos.

No caso da micobactéria, desenvolveu-se anticorpo primário de imunoglobulina de coelho anti-*Mycobacterium bovis* (anti-BCG). No início, esta técnica era utilizada para detectar antígenos de *M. leprae* em biópsias de nervo. Posteriormente, veio a ser empregada na pesquisa de várias micobactérias. Os estudos demonstraram maior sensibilidade da imunohistoquímica comparada aos métodos de coloração (Beck, Freeman, 1991; Whiley et al., 1991; Kutzner et al., 1998).

Estudos posteriores mostraram reação de imunohistoquímica, com o anti-BCG, positiva para alguns fungos e outras bactérias, difundindo-se o conceito de técnica para triagem da presença de bactérias e fungos. Não houve reação cruzada para espiroquetas, protozoários e vírus. A reação cruzada sugere que existe antigenicidade compartilhada entre os diferentes agentes. A estrutura da parede celular e seus componentes antigênicos estão relacionados com o poder de infectividade das diferentes bactérias e fungos (Beck, Freeman, 1991; Whiley et al., 1991; Kutzner et al., 1998).

### 3.4.4 Cultura

A cultura é considerada padrão ouro no diagnóstico da tuberculose cutânea e micobacteriose atípica. É possível isolar a *M. tuberculosis* em

amostras que contenham de 10 a 100 bacilos (Bollela et al., 1999; Ogusku et al., 2002). Sua especificidade é de 100% e a sensibilidade chega a 90% (Bollela et al., 1999).

A cultura de micobactérias deve ser realizada em meio sólido e líquido. Os meios sólidos são os de Löwestein-Jensen, Colestos ou agar, como o Middlebrook. Os meios líquidos incluem o de Kirchner ou caldo de Middlebrook 7H9. A maioria dos laboratórios faz cultura em meio sólido (Kox, 1995). O isolamento da micobactéria pela cultura requer cerca de oito semanas (Ferreira et al., 2002); a incubação por um período mínimo de quatro semanas é necessária para que se observe algum crescimento (Kox, 1995).

Existem três métodos mais rápidos: método radiométrico de Batec, Septi-check AFB e detecção de microcolônias em meio sólido (Kox, 1995).

O método radiométrico de Batec 460 (Benton Dickinson Instrument System, Sparks, MD, USA) é um sistema automatizado que detecta a liberação de CO<sub>2</sub> pela bactéria durante o metabolismo e decarboxilação de estruturas marcadas com carbono. Permite a identificação de micobactérias na metade do tempo necessário para meio de cultura sólido; apresenta positividade semelhante a dos meios de cultura tradicionais. A implantação do sistema requer investimento e ajuste do laboratório para lixo radioativo.

O método Septi-check AFB (Benton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) consiste em fase líquida do caldo de Middlebrook 7H9 associado a três meios sólidos: ágar de Middlebrook 7H11, meio com

ovo e ágar chocolate. O sistema bifásico requer mais tempo, três semanas, comparado ao Batec que precisa de duas semanas. Este método é mais barato que o Batec, porém mais caro que os meios convencionais (Kox, 1995).

O terceiro método é o de isolamento de micobactérias por detecção de microcolônias em meio sólido, são placas finas do ágar de Middlebrook 7H11 inoculadas e examinadas microscopicamente. É um método que consome mais tempo e a detecção de micobactéria é menos eficiente.

Após a cultura, a identificação inclui parâmetros como taxa de crescimento em diferentes temperaturas, morfologia da colônia, produção de pigmento e susceptibilidade às drogas. Com a utilização dos métodos convencionais, a identificação pode levar de duas a quatro semanas.

A nova forma de identificação das micobactérias é por meio do uso de técnicas de hibridização e PCR (Kox, 1995. Ferreira et al., 2002). O método de ELISA também pode ser empregado para identificação de culturas pela utilização de anticorpos monoclonais e policlonais (Kox, 1995).

### **3.4.5 Teste da tuberculina**

A prova da tuberculina, Mantoux ou teste da tuberculina, está baseada na injeção intradérmica de 0,1 unidades de tuberculina, desencadeando a reação de hipersensibilidade do tipo tardia a certos componentes antigênicos de filtrados de extratos de cultura (tuberculina). A PPD, uma proteína purificada derivada da tuberculina, é constituída por



proteínas filtradas da tuberculina, de baixo peso molecular (menores que 10.000 k Da), polissacarídeos e lipídios. O teste tuberculínico avalia a exposição ao *M. tuberculosis*, porém não discrimina doença ativa de vacinação ou infecção passada (Kox, 1995).

Por apresentar baixo peso molecular, a PPD não sensibiliza os indivíduos não expostos à micobactéria. Após a injeção intradérmica de PPD, ocorre o fenômeno de hipersensibilidade tardia. As células T sensibilizadas liberam linfocinas, induzindo a formação de nódulo, vasodilatação, edema, depósito de fibrina e inflamação. Vesiculação e necrose podem ocorrer; a reação inicia-se em mais ou menos seis horas e a reação máxima ocorre entre 48 e 72 horas (American Thoracic Society, 2000; Aggarwal et al., 2002).

A interpretação do teste tuberculínico deve ser feita com cuidado; existem fatores que causam reação do tipo falso negativo, como individuais, infecções, drogas, doenças sistêmicas, qualidade da tuberculina, aplicação e leitura. Os resultados falsos-positivos podem ocorrer em indivíduos infectados por outras micobactérias e reação por vacina de BCG. A reação cruzada tende a apresentar nódulo pequeno, sendo comum em áreas onde a micobactéria é prevalente (American Thoracic Society, 2000; Aggarwal et al., 2002).

Para a interpretação dos resultados, há que se considerar os fatores de risco:

- alto risco - paciente com SIDA e contactante de paciente com infecção ativa
- risco moderado – indivíduo que mora, morou ou viajou para região de alta prevalência de tuberculose, usuário de drogas injetáveis, trabalhador da área da saúde, indivíduos que vivem em asilos ou penitenciárias, criança em idade escolar ou menor de quatro anos, indivíduos sem-teto, ou com 10% a menos do peso ideal ou que sofrem de diabetes, insuficiência renal, leucemia, câncer ou mesmo os com retirada parcial do estômago
- baixo risco – indivíduo que não se enquadra nas demais categorias

A reação é considerada negativa, quando a pápula for menor que 5 mm a todos os grupos. Nos indivíduos do grupo de alto risco, pápula de 5 mm é considerada reação positiva e pode indicar tuberculose infecção. Pápula de até 10 mm é uma reação positiva em indivíduos de risco moderado. Nódulo maior de 15 mm é reação positiva em indivíduos de baixo risco (American Thoracic Society, 2000; Aggarwal et al., 2004).

Em nosso meio, a doença é prevalente, o resultado deve ser interpretado: pápula menor de 5 mm, resultado negativo; entre 5 a 9 mm, contato com micobactéria atípica ou vacinação por BCG; nódulo maior de 10 mm, exposição ao *M. tuberculosis* passada ou presente. A prova da tuberculina pode ser negativa em 25% dos pacientes com tuberculose (American Thoracic Society, 2000; Aggarwal et al., 2004).

### 3.4.6 Reação em cadeia da polimerase

A *M. tuberculosis* tem uma “meia vida” de quase 20 a 24 horas, resultando em lento crescimento em cultura, mesmo com o sistema radiométrico (Roth et al., 1997).

O diagnóstico laboratorial é fundamental, tanto para a doença, como para monitorar a terapia e prevenir sua transmissão. Para melhorar a acurácia e diminuir o tempo consumido no diagnóstico, foram introduzidas novas técnicas (Roth et al., 1997).

Nos anos de 1970, surgiram a hibridização “in situ” e os testes imunológicos, assim, o grande avanço não só no diagnóstico da tuberculose como das doenças infecciosas, em geral, foi a introdução de métodos com amplificação de ácidos nucleicos. As técnicas de amplificação do material genômico reduzem o tempo necessário para a geração de microrganismos em meios de cultura pela reprodução enzimática de ácidos nucleicos (Roth et al., 1997).

Em 1989, Brisson-Nöel fez a primeira descrição do uso da PCR para micobactérias, este método é o mais usado para amplificação do ácido nucleico das micobactérias (Roth et al., 1997).

Além da PCR, existem outros métodos de amplificação, como a reação em cadeia da ligase (LCR), a amplificação mediada por transcrição (TMA), a amplificação baseada na seqüência de ácidos nucleicos (NASBA), a amplificação do gene do ácido ribonucleico ribossômico (rRNA) e outros, todos com o objetivo de reduzir o tempo para detecção das micobactérias,

aumentar sensibilidade, especificidade e automatizar o diagnóstico. Existem testes comerciais, utilizando PCR, TMA e LCR. Cada método tem as suas vantagens, porém seu uso ainda é discutível, sobretudo, no diagnóstico de tuberculose cutânea e micobacterioses atípicas (Roth et al., 1997).

Na execução da reação da PCR, existem algumas questões fundamentais, quais sejam: como se evitar a contaminação, qual a melhor forma de preparo da amostra e qual a melhor seqüência-alvo.

O primeiro passo é escolher qual o melhor alvo de amplificação, assim uma das estratégias é a amplificação de material que permita a identificação do gênero micobactéria. A literatura descreve métodos com emprego de genes que codificam proteínas comuns às micobactérias, como o gene da proteína do choque 65-kDa ("heat shock protein") ou 16S r RNA, ou ainda, 23S RNA e 23S -16S rRNA (Telenti et al., 1993; Cook et al., 1994; Richter et al., 1995; Tan et al., 1999; Quiros et al., 2000; Ena et al., 2001; Tan et al., 2001; Ogusku et al., 2002; Hsiao et al., 2003; Honore-Boukaline et al., 2003).

Assim, a identificação da espécie é realizada em etapa seguinte por meio da hibridização, seqüenciamento ou corte por enzimas de restrição.

O uso da seqüência de inserção repetitiva do genoma de micobactéria do complexo *M. tuberculosis* (IS 6110), descrito por Eisenach et al., é um dos métodos mais utilizados (Margall et al., 1996). A especificidade e a natureza repetitiva do iniciador são elementos que fazem

dessa seqüência-alvo ideal para a amplificação pela PCR (Margall et al., 1996).

A sensibilidade do método de amplificação é de 1 a 20 cópias. Bollela et al. descrevem a sensibilidade de três bacilos da cepa de *M. tuberculosis* HRa37 em solução-padrão com o uso desse protocolo (Bollela et al., 1999).

Recentemente, descreveu-se a homologia da região IS 6110 com outras micobactérias atípicas (Margall et al., 1996). A *M. ulcerans* e a *M. gilvum* também podem ser amplificadas por esse protocolo (Roth et al., 1997).

A escolha do método para a preparação da amostra está, acentuadamente, relacionada ao resultado final do protocolo. A primeira limitação refere-se à distribuição da micobactéria que ocorre de forma irregular na amostra e, geralmente, apresenta poucos bacilos. A micobactéria tem uma parede glicoproteica resistente à lise para extração de DNA e RNA e, com freqüência, as amostras contêm inibidores de amplificação resultantes da extração (Roth et al., 1997). A purificação do material é essencial para se evitar a interferência dos inibidores na eficiência da amplificação da seqüência-alvo (Roth et al., 1997).

Marchetti et al. (1998) citados por Ogusku et al. (2002) <sup>1</sup> demonstraram que a concentração de DNA do material extraído pode

---

<sup>1</sup> Marchetti G, Gori A, Catozzi L, Vago L, Nebuloni M, Rossi MC, Esposti AD, Bandera A, Franzetti F. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues; comparison of four amplification assays. *J Clin Microbiol.*, 36:1512-1517, 1998.

interferir, resultando em reações falsos-negativas de PCR (Ogusku et al., 2002).

Os autores citados verificaram que quantidades de 5 µg resultam em 33% de falsos-negativos, quando o sítio de amplificação é a região IS 6110, quando a concentração cai para 1 a 3 µg, a ocorrência de falso-negativo cai para 13%, demonstrando que a concentração de DNA é extremamente importante para o resultado do protocolo da PCR (Ogusku et al., 2002).

Os espécimes de maior interesse para o uso de testes moleculares são do trato respiratório, material de biópsias e líquido cérebro-espinhal. Existem vários problemas técnicos ainda de difícil resolução para o método de PCR, como a adequação de amostras de linfonodo, sangue, plasma e esfregaço (Roth et al., 1997). Os testes comerciais ainda não estão padronizados para amostras extrapulmonares (Roth et al., 1997), e a grande variedade de protocolos é realizada com métodos de PCR não comerciais, sem padrão estabelecido (Roth et al., 1997).

Na literatura, existem vários relatos de estudos de sensibilidade e especificidade em diferentes espécimes, com distintas formas de preparação e também seqüência-alvo variada (Telenti et al., 1993; Cook et al., 1994; Richter et al., 1995; Tan et al., 1999; Quiros et al., 2000; Tan et al., 2001; Ena et al., 2001; Ogusku et al., 2002; Hsiao et al., 2003; Honore-Boukaline et al., 2003).

A análise dos resultados torna-se variável, quando estes são comparados à cultura. Há resultados positivos em pacientes sem sinal

clínico da doença ou de sua atividade. Questiona-se se esses resultados são falsos-positivos por contaminação, detecção de seqüência-alvo de micobactérias sem viabilidade do bacilo, infecção latente, ou mesmo, detecção após tratamento adequado (Bollela et al., 1999).

A sensibilidade é variável e depende, nitidamente, do número de bacilos na amostra e diminui em formas paucibacilares. A perda de bacilos durante a preparação, sua distribuição irregular e a presença de inibidores da reação levam a resultados discrepantes e que comprometem o resultado final (Roth et al., 1997).

Apesar de ainda controversa, a aplicação dos métodos de amplificação de nucleotídeos é mundialmente utilizada; para amostras pulmonares, parece ser considerado consenso pelas várias séries de estudos controlados e testes comerciais. Em contraste, o uso da metodologia em amostras extrapulmonares requer ainda maior investigação para emprego e padronização da técnica (Roth et al., 1997).

A sensibilidade, levando-se em conta todos os métodos de amplificação e de vários tecidos, é de 65%-95% quando comparada à cultura (Roth et al., 1997).

Na literatura, são encontradas várias referências do uso da PCR para diagnóstico de tuberculose cutânea e micobacterioses atípicas, porém a maioria é composta de relatos de poucos casos. As maiores séries são dirigidas ao diagnóstico da tuberculose cutânea. Muitas séries estudam a

especificidade e a sensibilidade da PCR em tecidos diferentes e incluem também espécimes cutâneos na análise.

Outra dificuldade de comparação reside na diferente forma de extração dos ácidos nucleicos dos diversos protocolos de ampliação e do padrão-ouro utilizados (Telenti et al., 1993; Cook et al., 1994; Richter et al., 1995; Tan et al., 1999; Quiros et al., 2000; Tan et al., 2001; Ena et al., 2001; Ogusku et al., 2002; Hsiao et al., 2003; Honore-Boukaline et al., 2003).

Margall et al. (1996) detectaram DNA de *M. tuberculosis* complex em 77% de várias formas de tuberculose cutânea em material parafinado, utilizando iniciador de 123 pares de base da seqüência IS 6110. A sensibilidade da PCR foi de 90% comparada a 65% da cultura. Degitz et al. (1996) detectaram DNA de micobactéria em 53% de material parafinado de casos de lupus vulgar diagnosticados, clínica e histologicamente, tendo como alvo a seqüência não repetitiva do gene groEL.

Li et al. (2000) não conseguiram demonstrar DNA de micobactéria no eritema indurado de Bazin em pacientes com tuberculose pulmonar, porém no acompanhamento clínico as lesões regrediram, após dois meses de tratamento específico para tuberculose.

Senturk et al. (2002) utilizaram iniciadores que amplificavam moléculas da seqüência IS 6110 em 22 amostras de material parafinado arquivado e em 29 amostras de pele sã como controle. Os autores encontraram o DNA da *M. tuberculosis* em apenas uma amostra de tuberculose cutânea e uma de pele normal, discutindo a fixação, degradação



do DNA e presença de substâncias inibidoras como possíveis causas da não identificação de *M. tuberculosis*.

Na amostra de pele, a positividade foi discutida como possibilidade da presença de *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou Bacilo de Calmette-Guérin ou pela vacinação, uma vez que 80% da população turca onde o trabalho foi realizado, são vacinados. Não existem estudos sobre a detecção de DNA de micobactéria por PCR em população vacinada, comparada à população não vacinada.

Em 2003, Hsiao et al. estudaram 38 amostras parafinadas de arquivo (1996 - 2000) de 36 pacientes que apresentavam dermatite crônica granulomatosa com BAAR negativo com dois diferentes iniciadores. O primeiro tinha como seqüência-alvo o gene que codifica a 16S rRNA, que é comum a todas as micobactérias e o gene IS 6110 (específico para o complexo *M. tuberculosis*).

Após exclusão de quatro amostras por controle interno negativo realizado com gene de beta-globina, 22 amostras foram positivas para a seqüência 16S rRNA e 18, positivas para 16S rRNA e IS 6110.

Portanto, a tuberculose cutânea pôde ser diagnosticada nas 18 amostras (56% dos casos). Clinicamente, estas lesões foram classificadas como 11 lesões de tuberculose do tipo verrucosa, seis do tipo lupus vulgar e um caso de eritema indurado de Bazin. Os quatro casos restantes foram positivos só para a seqüência 16 S rRNA (12,5%), sendo diagnosticados como micobacteriose atípica.

Os autores citados discutiram que, em formas paucibacilares de tuberculose cutânea, a PCR é um método rápido e sensível para detecção de micobactérias em tecido parafinado. Discutiram ainda que, em Taiwan, a prevalência de tuberculose pulmonar é grande, explicando a maioria dos achados positivos para *M. tuberculosis* e as formas de micobacterioses atípicas não foram tão freqüentes (Hsiao et al., 2003).

Ena et al. (2001) estudaram oito pacientes com infecção cutânea por micobactérias atípicas que apresentavam manifestações clínicas variadas com nódulos, pápulo-pústulas, abscessos e lesões sarcoídicas. Ao exame histológico das lesões, em todas foi observada dermatite crônica granulomatosa. O teste tuberculínico foi negativo em seis pacientes e fracamente positivo em paciente com suspeita de infecção por *M. marinum* (confirmada posteriormente por cultura e PCR). Assim o protocolo empregado foi o da amplificação da sequência do gene hsp65 (gene da proteína do choque de 65k Da). O estudo foi realizado em espécime extraído de cultura de pele, amplificado pela PCR e comparado ao crescimento em cultura. O material de amplificação foi tratado por enzima de restrição para identificação da espécie. Desse modo, os autores identificaram três *M. chelonae*, duas *M. marinum*, duas *M. fortuitum* e uma *M. avium*. As identificações foram confirmadas por cromatografia líquida (HPLC). Os casos foram tratados, de acordo com a sensibilidade das drogas testadas, por um período de quatro a 30 semanas com resolução de todos os quadros.

Richter et al. (1995) estudaram amostras de vários tecidos em material parafinado de arquivo, usando protocolo com amplificação do gene

16S r RNA para PCR para identificação do gênero *Mycobacterium*. Posteriormente, descreveram um “nested” PCR, considerando esta técnica uma ferramenta importante para detecção de várias micobactérias. Inclusive a *M. leprae*, que não é cultivável, foi também identificada por esta técnica.

Tan et al. (1999) estudaram o uso da PCR para detecção de *M. tuberculosis* com a seqüência-alvo IS 6110 no diagnóstico de tuberculose cutânea e tuberculides em material parafinado de arquivo. Os autores só encontraram positividade em amostras de pacientes BAAR positivos e imunossuprimidos, concluindo que a PCR era útil em tais casos e na diferenciação de tuberculose cutânea e micobacteriose atípica.

Em outro trabalho, Tan et al. (2001) realizaram estudo em material parafinado, arquivado entre 1984 e 1999, de pacientes com tuberculose cutânea e tuberculides por meio do protocolo de amplificação do gene IS 6110 em “nested” PCR, comparado à cultura e diagnóstico final por acompanhamento clínico. O estudo foi realizado em 143 espécimes de 129 pacientes, sendo 14 imunossuprimidos com BAAR positivo, 44 paucibacilares, 47 com possível tuberculide, 6 com granuloma do tipo não tuberculose (sarcoidose e granuloma anular) e 18 com micobacteriose atípica. De acordo com o acompanhamento clínico, subdividiram os pacientes: 58 com tuberculose confirmada (cultura positiva e ou resposta a tratamento para tuberculose) e alta probabilidade de tuberculose (critério clínico-patológico) com formas multibacilares e paucibacilares e 47 pacientes com possível tuberculide. De 14 imunossuprimidos com BAAR positivo, a

PCR foi positiva em nove casos (100% de sensibilidade e especificidade quando comparada à evolução clínica).

Nas formas paucibacilares, a PCR foi positiva em 55% dos casos de tuberculose verrucosa (38 doentes) e em 60% de lupus vulgar (cinco doentes). Quando considerados os casos confirmados de tuberculose, a sensibilidade foi de 73%. Nos 26 casos de eritema indurado, a PCR foi positiva em 54% dos casos e a correlação com o acompanhamento terapêutico foi de 80% .

Os autores citados discutiram que a PCR deve ser considerada no painel diagnóstico da tuberculose cutânea. Em pacientes imunossuprimidos, é fundamental para o rápido diagnóstico, quando a presença de BAAR é positiva, para a pronta instituição da terapêutica e para diferenciação de tuberculose com micobacteriose atípica.

Em formas paucibacilares, a decisão diagnóstica não deve ser baseada unicamente na PCR. Nos portadores de eritema indurado de Bazin, houve correlação, sobretudo, quando comparado à resposta terapêutica (Tan et al., 2001). Os autores também relataram que a experiência do trabalho anterior não tinha sido boa com o uso do protocolo e melhoraram a sensibilidade no trabalho posterior utilizando uma “nested” PCR (Tan et al., 1999; Tan et al., 2001).

Honoré-Boukaline et al. (2003) estudaram o impacto da preparação de amostras extrapulmonares e extração de DNA no resultado final da PCR, por meio do teste comercial Cobas Amplicor (Roche), concluíram que a

maior dificuldade no processo de extração é a lise da parede da micobactéria. A diferença na detecção pode ocorrer até pelo uso de diferentes tampões.

Os autores também discutiram a diferença entre amostras extrapulmonares e pulmonares, em relação ao número e irregularidade de distribuição do bacilo na amostra. O segundo maior problema é a presença de inibidores. O maior índice de inibição foi encontrado em amostras cutâneas (70,8% com o uso do tampão PK-PCR e 50% com o tampão CTAB-PCR). Os autores ainda relataram a importância da diluição da amostra em até um oitavo para a diminuição de inibidores da reação, quais sejam, detergentes ou sangue.

Quiros et al. (2000) estudaram a presença de *M. tuberculosis* em dez amostras que apresentavam indícios clínico-patológicos de tuberculose pápulo-necrótica em pacientes com PPD maior que 20 mm, cultura negativa e sem foco aparente de tuberculose. A PCR foi positiva em 80% das amostras.

Em trabalho realizado no Brasil, foi estudada a utilização da PCR no diagnóstico da tuberculose cutânea em 37 amostras "a fresco" de pacientes com suspeita clínica da doença que foram comparadas à cultura. Os autores avaliaram o uso da seqüência-alvo do gene 16S r DNA, sendo a PCR positiva em 24,32% das amostras e, em razão da baixa sensibilidade do método (43,7%), repetiram a PCR, porém com iniciadores baseados na seqüência-alvo IS 6110. A sensibilidade e a especificidade foram de 100% quando comparadas à cultura (Ogusku et al., 2002).

Telenti et al. (1993) e Cook et al. (1994) descreveram os pares de iniciadores baseados na proteína do choque de 65 kDa que são comuns a várias espécies de micobactérias e, após a amplificação, foi feito tratamento com enzimas de restrição para identificação da espécie. Os autores discutiram que o seqüenciamento é uma ferramenta importante para identificação da espécie, porém é extremamente trabalhoso e de difícil implementação na rotina clínica.

Cook et al. (1994) usaram três enzimas de restrição diferentes. O protocolo foi estudado em 126 espécimes de cultura e algumas amostras de tecido parafinado de arquivo. Para a cultura, a PCR foi positiva em 82% dos espécimes testados: 35/35 *M. tuberculosis*, 33/40 *M. avium-intracellulare*, 20/32 *M. gordonae*, 5/5 *M. chelonae*, 4/6 *M. fortuitum*, 3/3 *M. kansasii*, 1/1 *M. marinum*, 1/1 *M. scrofulaceum*, 1/1 *M. terrae*. A *M. flavescens* não foi amplificada pelo protocolo. Desse modo, os autores discutiram que no resultado final do algoritmo algumas micobactérias apresentaram padrão único e outras, padrão comum ao corte. Nas amostras parafinadas, foram identificadas *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii* e *M. chelonae*. Algumas não apresentaram corte às enzimas de restrição e, posteriormente, foi diagnosticado por critério clínico-patológico a infecção por *M. leprae* (Cook et al., 1994).

Os autores ainda discutiram que as espécies podem apresentar polimorfismo, levando a diferentes tamanhos de fragmentos, quando tratadas pelas enzimas de restrição. Por meio do protocolo, pode-se observar que o fenômeno é comum para *M. avium-intracellulare* (três

possibilidades no algoritmo) e não para *M. tuberculosis* (apenas um padrão, quando tratada pelas enzimas de restrição). Das 126 amostras testadas, 18% (23 amostras) não foram amplificadas. Das 23 amostras, 15 não foram amplificadas por outros métodos, indicando talvez problemas com a extração. Sugeriu-se que as oito micobactérias restantes que não foram amplificadas pelo protocolo, tenham apresentado polimorfismo do DNA, com incompatibilidade com os iniciadores. As três amostras de *M. kansasii* foram amplificadas, após diluição para reamplificação, mostrando alguma interferência de concentração. Os autores finalizam a discussão mostrando que o nível de sensibilidade do protocolo depende de compatibilidade da espécie e da cepa presentes na amostra com o protocolo estudado (Cook et al., 1994).

Li et al. (2000) estudaram 115 amostras (fixadas em formol e emblocadas em parafina) de vários tecidos com dermatite crônica granulomatosa com pesquisa de BAAR negativa, por meio de par de iniciadores baseados na seqüência repetitiva IS 6110. A positividade foi de 59% dos casos. A sensibilidade da PCR foi de 73% e a especificidade de 72%. A sensibilidade da cultura foi de 42% e a especificidade de 100%.

## 4. Métodos

---



#### **4.1 Amostras**

Blocos de parafina de biópsias de pele de pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, com hipótese diagnóstica de tuberculose e ou micobacteriose atípica, arquivados no Laboratório de Patologia do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período compreendido entre 1990 a 2004, foram selecionados para o presente estudo.

#### **4.2 Critérios de inclusão e de exclusão**

Todos os blocos de parafina dos doentes com diagnóstico clínico de tuberculose cutânea e ou micobacteriose atípica foram incluídos, e como critério de exclusão utilizou-se a PCR para gene constitutivo da beta actina negativa.

### **4.3 Exames**

Nos blocos de parafina incluídos foram feitas a PCR, a coloração para bacilo-álcool-ácido resistente (BAAR) e a imunohistoquímica. Os resultados da cultura e do teste tuberculínico foram obtidos por meio do levantamento de prontuário dos pacientes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

### **4.4 Padrão de referência**

O padrão de referência utilizado foi a evolução clínica dos doentes por intermédio da revisão de prontuário. Quanto à evolução clínica, considerou-se como caso confirmado aqueles em que o paciente respondeu a tratamento clínico com as drogas preconizadas para tuberculose e ou micobacteriose atípica.

#### **4.5 Avaliação da PCR e exames subsidiários**

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia de todos os métodos diagnósticos foram avaliados e comparados ao padrão de referência evolução clínica.

#### **4.6 Exame anátomo-patológico e coloração para BAAR**

Os exames anátomo-patológicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, a coloração para hematoxilina-eosina e coloração para BAAR foram feitas pelo método de FARACO (Behmer et al., 1976).

O fragmento de pele biopsiado era colocado em formol a 10% e emblocado em parafina para corte e confecção das lâminas para coloração por hematoxilina-eosina. Houve modificação do método, após o ano 2000, com uso de formol a 10% tamponado, porém com confecção de blocos de parafina em até 24 horas e sem conter cera de abelha.

#### 4.7 Exame imunohistoquímico

Os exames imunohistoquímicos foram realizados no Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio-Libanês pelo método imunohistoquímico da estreptavidina-biotina peroxidase para pesquisa de micobactérias em tecido (Taylor, Cote, 1994).

Realizaram-se cortes histológicos de 4 a 6  $\mu\text{m}$  do bloco de parafina contendo fragmento de pele, em lâminas tratadas com silano, desparafinado em estufa a 60°C por 30 min e em banho com xilol aquecido. Após a hidratação com álcoois graduados (99°, 95° e 80°), foram lavadas em água corrente e destilada e submetidas a desmascaramento antigênico pelo calor.

As lâminas foram submersas em tampão citrato 1mM, pH 6.0 em microondas doméstico, na potência máxima, por 5 minutos. Após resfriamento e lavagem, foram submetidas a bloqueio da peroxidase endógena a 3% (10 volumes) em dois banhos de 5 minutos. Após lavagens em água corrente e tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7.6, foram incubadas por 16 h a 4°C com o anticorpo primário, *Mycobacterium bovis*, policlonal (Dako, Glostrup, Dinamarca) na diluição 1:100. Depois de lavagens em TRIS-HCL para remoção do anticorpo ligado de maneira não específica, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário, complexo estreptavidina biotina, 1:400, e complexo de amplificação avidina-biotina-peroxidase (StreptABC kit, Dako).

Diaminobenzidina (DAB) foi utilizada como substância cromogênica, 1mg/ml em tampão PBS, acrescido de peróxido de hidrogênio 0,02% por 15 min. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris, 3 minutos, seguidas por banhos de hidróxido de amônia a 10%, água corrente e destilada e desidratadas com álcoois graduados (50%, 80%, 95% e 99%), clareamento em três banhos de xilol e montagem com lamínula.

#### **4.8 PCR**

O exame de PCR foi realizado no Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio-Libanês

A extração do DNA das amostras parafinadas foi feita utilizando xilol para remover a parafina do espécime e extraído o DNA pelo método de fenol-clorofórmio (Wright, Manos, 1990).

A PCR foi realizada, segundo o protocolo de Cook et al., com algumas modificações (Cook et al., 1994). O critério de exclusão utilizado foi a PCR para beta actina negativa. A beta actina é controle de integridade do DNA. Se a PCR do gene da beta actina for positiva significa que a amostra contém, pelo menos, uma fita dupla de DNA intacto para amplificação e que as impurezas estão diluídas para não impedir a polimerização (Thomas et al., 2001). Após a comprovação da presença e qualidade do DNA na amostra pela PCR do gene da beta actina, esses espécimes foram submetidos a PCR para micobactérias.

### PCR para gene da beta actina

As reações de PCR foram realizadas com 25 µl de volume final, contendo tampão para PCR – 1X (KCl 5,0 mM ; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; Tris-HCl 1,0 mM - pH9,0), 400 nM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), 400 nM de cada iniciador (iniciadores), 1,25 U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, San Diego, CA, EUA) e água deionizada estéril. A concentração final de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) foi de 0,75 mM. Os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen, San Diego, CA, EUA).

A reação foi colocada em um termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 (Branchburg, NJ, EUA) ou PTC 100™ Programmable Thermal Controller (M.J.Research, Inc, Watertown, Mass, EUA).

A temperatura e o tempo das fases de desnaturação, hibridação e extensão, que caracterizam a reação da PCR utilizada para a amplificação do gene da beta actina, foram: 95°C por 2 minutos (95°C / 45''; 58°C / 45''; 72°C/ 45'') por 45 vezes. A reação foi finalizada com temperatura de extensão a 72°C por 5 minutos e, ao final dos ciclos, a reação foi interrompida com resfriamento a 4°C.

Para evitar contaminação na extração de DNA e na PCR, utilizaram - se apenas ponteiras com barreira de 1,0 a 40 µl e de 20,0 a 200 µl, modelo Diamond DF 200 tipack da Gilson (Emeryville, CA, EUA) e da LABCON (San Rafael, CA , EUA).

As seqüências dos iniciadores utilizados para as reações foram:

5´- CAG GGT ACA TGG TGG TGC – 3´ “forward”

5´- AGC GGG AAA TCG TGC GTG – 3´ “reverse”

Todas as reações foram analisadas utilizando gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. O resultado esperado foi um produto em torno de 300 pares de base (pb).

### **PCR para micobactéria**

Foram realizadas duas etapas “nested” PCR:

1) Primeira etapa:

T1U1 AAG GAG ATC GAG CTG GAG GA

T1U2 AGG CGT TGG TTC GCG AGG G

T1D TGA TGA CGC CCT CGT TGC C

O produto final apresentou 310 e 231 pb

2) Segunda etapa (reamplificação):

T2U GTC TCA AAC GCG GCA TCG

T2D GTC ACC GAT CTG GTC

O produto final apresentou 133 pb

Os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen, San Diego, CA, EUA).

As reações de PCR foram realizadas com 50µl de volume final após adição de 10µl de DNA. A reação contém 200µM de dNTP (Invitrogen, San

Diego, CA, EUA), com 2,5 ng/μl de cada iniciador, 1 unidade de Taq polimerase (Invitrogen) e concentração final de cloreto de magnésio de 1,5mM.

A reação foi colocada em um termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 (Branchburg, NJ, EUA) ou PTC 100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller (M.J.Research, Inc, Watertown, Mass, EUA).

A temperatura e o tempo das fases de desnaturação, hibridação e extensão que caracterizam a reação da PCR utilizada para a amplificação na primeira etapa da PCR foram: 94°C por 4 minutos, (94°C / 1 minuto; 57°C/ 2 minutos; 72°C/ 2 minutos; 72°C/ 7 minutos) por 35 vezes. A reação foi finalizada com resfriamento a 4°C.

Para evitar contaminação na extração de DNA e na PCR foram usadas apenas ponteiras com barreira de 1,0 a 40 μl e de 20,0 a 200 μl, modelo Diamond DF 200 tipack da Gilson (Emeryville, CA, EUA) e da LABCON (San Rafael, CA, EUA).

A amplificação na segunda etapa foi feita com 5μl da primeira etapa de PCR adicionados a 45μl dos iniciadores da segunda etapa com as mesmas concentrações de reagentes mencionadas na primeira etapa. A temperatura e tempo das fases de desnaturação, hibridação e extensão que caracterizam a reação da PCR utilizadas para a amplificação na segunda etapa da PCR foram: 94°C por 4 minutos (94°C /4 minutos, 94°C / 1 minuto; 52°C/ 2 minutos; 72°C/ 2 minutos; 72°C/ 7 minutos) por 35 vezes. A reação foi finalizada com resfriamento a 4°C.



### **Digestão com enzimas de restrição**

Cerca de 10 a 12 $\mu$ l do produto final da segunda etapa de PCR foram digeridos separadamente com cada enzima de restrição Hha1 (Gibco BRL, Gaithensburg, MD, EUA), Mbo1 (Mannheim Boehringer, Mannheim, Germany) e BstU1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) a 37°C por 4 horas. Cada um dos produtos (10 $\mu$ l) foi preparado para correr no gel com blue juice (2 $\mu$ l).

A enzima Hha1 quebra a fita de DNA na seqüência GCGC, a enzima Mbo1 quebra a fita na seqüência GATC e a enzima BstU1 quebra a fita na seqüência CGCG.

Todas as reações foram analisadas, utilizando gel de agarose 2% com 3% NuSieve, corado com brometo de etídeo. A leitura do algoritmo explica a forma de identificação das micobactérias (Figura 1).

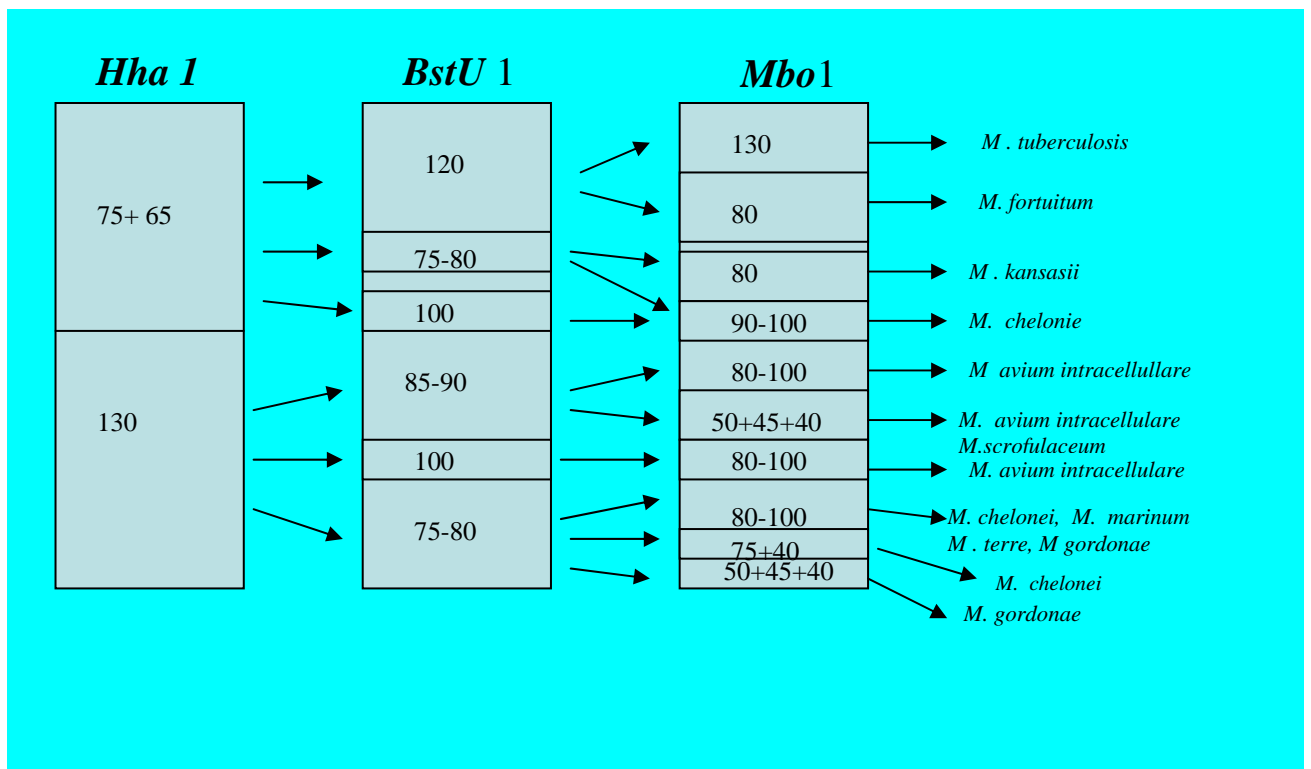


Figura 1- Leitura do algoritmo após PCR genérico para micobactérias com tratamento por enzimas de restrição

Hha1, BstU1 e Mbo1 Hha1, Mbo1 e BstU1 – enzimas de restrição

Fonte: Cook SM, Bartos RE, Pierson CL, Frank TS. Detection and characterization of atypical mycobacteria by the polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3:53-8.

#### 4.9 Teste tuberculínico

A tuberculina padronizada para uso no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo é a Tuberculin PPD RT 23 SSI 2 UT/0,1 ml Statens Serum Institut 5 Artillerivej 2300 Cph S., Denmark. O teste é realizado com injeção de 0,1cc

intradérmico no antebraço (face ventral) e a leitura é feita em 48 horas. O resultado é descritivo, sendo mensurados o tamanho do eritema, pápula ou nódulo e a ausência de reação.

#### **4.10 Cultura**

A cultura do fragmento de pele obtido por biópsia foi realizada no laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e ou Instituto Adolpho Lutz.

A amostra é submetida à centrifugação, seu sedimento é semeado e sua leitura é semanal por um período de 60 dias. A cultura para micobactérias é realizada em meio sólido de Löwestein-Jensen (35<sup>0</sup>C) e em ágar chocolate (30<sup>0</sup>C). No Instituto Adolpho Lutz, as micobactérias são ainda submetidas a três diferentes temperaturas para avaliação do crescimento em cultura (26<sup>0</sup>C, 37<sup>0</sup>C, 45<sup>0</sup>C). A identificação da micobactéria é feita em relação à velocidade de crescimento na cultura: rápida em menos de sete dias e lenta, quando há crescimento, após sete dias de incubação.

Posteriormente, são analisadas a morfologia da cultura: rugosa e não rugosa e a presença de pigmento: escotocromógenas, fotocromógenas e não cromógenas. A partir do cultivo bacteriano e dos testes clínicos enzimáticos e metabólicos “in vitro”, confirma-se a origem da infecção. Dentre alguns testes presuntivos para triar o grupo patogênico, destacam-se

as observações fenotípicas: a morfologia das colônias em meio de cultura e na lâmina de microscópio corado pelo método Ziehl-Neelsen, a demonstração do “fator corda” – bacilos compactados seguidos formando uma corda de navio. Os seguintes testes bioquímicos são feitos para acompanhar a identificação até o final: produção de niacina, nitrato, hidrólise “Tween 80”, atividade ureásica, atividade catalásica, captação do ferro, arilsulfatase, telurito de potássio. As culturas também são submetidas ao teste de inibição de crescimento. De acordo com suas características nos diferentes parâmetros, a micobactéria é identificada (Quadro 5).

**Quadro 5 - Provas bioquímicas**

<b>Prova bioquímica</b>	<b>Cepa controle</b>	<b>Resultado esperado</b>
Arilsulfatase	CEPA <i>M. fortuitum</i> (doméstica)	positivo
Catalase SQ,TA, 68 <sup>o</sup> C	CEPA <i>M. tuberculosis complex</i> (doméstica)	positivo
Catalase SQ,TA, 68 <sup>o</sup> C	CEPA <i>M. fortuitum</i> (doméstica)	negativo
Captação do Ferro	CEPA <i>M. fortuitum</i> (doméstica)	positivo
Captação do Ferro	CEPA <i>M. chelonae</i> (doméstica)	negativo
Crescimento em agar Mac Conkey	CEPA <i>M. avium complex</i> (doméstica)	positivo
Crescimento em agar Mac Conkey	CEPA <i>M. tuberculosis complex</i> (doméstica)	negativo
Niacina	CEPA <i>M. tuberculosis complex</i> (doméstica)	positivo
Nitrato	CEPA <i>M. tuberculosis complex</i> (doméstica)	positivo
Tolerância NaCl 5%	CEPA <i>M. fortuitum</i> (doméstica)	positivo
Tolerância NaCl 5%	CEPA <i>M. kansasii</i> (doméstica)	negativo
Redução de Telurito	CEPA <i>M. fortuitum</i> (doméstica)	positivo
Hidrólise de Tween 80	CEPA <i>M. kansasii</i> (doméstica)	positivo
Hidrólise de Tween 80	CEPA <i>M. avium complex</i> (doméstica)	negativo
Uréia	CEPA <i>M. avium complex</i> (doméstica)	positivo

## 4.6 Estatística

Avaliar a exatidão de um método consiste em compará-lo com outro já consagrado. Na literatura para diagnóstico da tuberculose e micobacteriose atípica, a cultura é considerada como padrão-ouro. Mas a existência tanto de lesões paucibacilares como do tipo tuberculíde, nas quais a micobactéria pode não estar presente ou estar presente em número reduzido e ou não estar viável, prejudica o uso da cultura como padrão de referência.

A literatura inclusive avalia a PCR, comparando formas paucibacilares e multibacilares com diferença importante entre resultado da cultura, pesquisa de BAAR e PCR nos dois grupos distintos. Para evitar esse fator, considera-se como padrão de referência, a evolução clínica do doente.

Estatisticamente falando, a avaliação da eficácia de um teste, ou mesmo, de um modelo é realizada por meio da análise da Tabela 2x2 (Figura 2). Esta é uma técnica em que uma determinada amostra é dividida em quatro grupos, segundo o estado de acometimento ou não por uma determinada doença e de apresentar resultado positivo ou negativo no exame.

	Doença (+)	Doença (-)
Teste (+)	a	b
Teste (-)	c	d

**Figura 2** – Tabela 2x2

Neste caso, “a” indica a quantidade dos que apresentaram a condição a ser detectada e cujos resultados no teste foram, de fato, positivos. Já “b” é o total daqueles que, apesar de não apresentarem a condição, tiveram testes positivos. O valor “c” indica todos os que, mesmo apresentando a condição, tiveram resultados negativos no teste. Finalmente, “d” é o número dos que não apresentaram a condição e cujos resultados no teste foram, efetivamente, negativos.

A sensibilidade é a fração dos doentes que o teste é capaz de detectar. A especificidade é a proporção de não doentes que o teste é capaz de detectar. O valor preditivo positivo é a fração dos indivíduos com teste positivo que efetivamente têm a doença. O valor preditivo negativo é a fração dos indivíduos com teste negativo que efetivamente não têm a doença.

Acurácia é o somatório dos doentes que apresentam teste positivo e dos não doentes que apresentam teste negativo em relação ao número total de indivíduos estudados.

$$\text{Sensibilidade} = [a / a+c] \times 100$$

$$\text{Especificidade} = [d / d+b] \times 100$$

$$\text{VPP} = [a / a+b] \times 100$$

$$\text{VPN} = [d / c+d] \times 100$$

$$\text{Acurácia} = [a+d / a+b+c+d] \times 100$$

**Figura 3** – Fórmula para cálculo da sensibilidade, especificidade, VPP e VPN

O cálculo de significância foi realizado por meio do teste de McNemar, que é um teste não-paramétrico, que verifica a concordância entre duas variáveis categóricas dependentes. Quando  $p$  é maior que 0,05 indica que há concordância entre as variáveis.



## 5. Resultados

---

Foram selecionados 220 blocos de parafina, destes apenas 34 amostras de 32 pacientes apresentaram a PCR para beta actina positiva e foram incluídas no estudo (amostras obtidas, após o ano 2000, com a modificação da metodologia de fixação e confecção de blocos de parafina).

Dos trinta e dois pacientes incluídos, 14 eram do sexo masculino e 18 do sexo feminino, com idade variando de 14 a 79 anos com média de 43 anos.

O resumo do quadro clínico, hipóteses diagnósticas clínicas, exame anátomo-patológico, pesquisa para BAAR, imunohistoquímica, PPD, cultura, PCR , identificação da espécie, doença associada e evolução clínica encontram-se no Quadro 6.

**Quadro 6 - Resumo do quadro clínico, hipóteses diagnósticas clínicas, exame anátomo-patológico, pesquisa para BAAR, imunohistoquímica, PPD, cultura, PCR , identificação da espécie, doença associada e evolução clínica**

paciente	Quadro clínico	Diagnóstico inicial	AP	BAAR	IHQ	PPD	cultura	PCR	espécie	evolução clínica ou conclusão diagnóstica	doença associada	evolução clínica
1	nódulos ulcerados e infiltrados na fronte, face e região cervical	leishmaniose x micobacteriose atípica	dcg com plasmocitose	neg	neg	neg	...	pos	<i>M. gordonae</i> , ou <i>M. terrae</i> ou <i>M. chelonae</i> ou <i>M. marinum</i>	leishmaniose	não	negativa
2	lesões infiltradas sarcoídicas na região frontal	lupus vulgar x sarcoidose x hanseníase	dcg	neg	neg	neg	neg	neg		hanseníase	não	negativa
3	nódulo inflamatório no membro inferior	eritema nodoso x indurado de Bazin	paniculite lobular e septal com vasculite	neg	pos	neg	neg	pos		eritema nodoso-paciente tratada com esquema tríplice com regressão	não	positiva
4	placa endurecida no lábio inferior	sarcoidose x micobacteriose x tuberculose orificial	dcg	neg	pos	neg	neg	neg		sarcoidose - respondendo a corticóide intralesional	não	negativa
5	placa inflamatória com ulceração na panturrilha direita	eritema indurado de Bazin	dcg com necrose caseosa	neg	neg	pos	neg	pos	<i>M. tuberculosis</i>	eritema indurado de Bazin - paciente com surtos de lesões ulceradas nos membros inferiores com necrose caseosa fazendo esquema tríplice com melhora. O foco de tuberculose à distância não foi identificado.	não	positiva

continua

continuação

paciente	Quadro clínico	Diagnóstico inicial	AP	BAAR	IHQ	PPD	cultura	PCR	espécie	evolução clínica ou conclusão diagnóstica	doença associada	paciente
6	lesões papulosas com necrose central na face e pescoço	tuberculíde pápulo necrótica	dcg com necrose caseosa	neg	neg	pos	neg	pos		tuberculíde pápulo-necrótica -parou tratamento com esquema tríplice e após 6 meses reapareceram algumas lesões. Resposta a tratamento com claritromicina	não	positiva
7	lesões nodulares infiltradas disseminadas	hanseníase x micobacteriose atípica	dcg	neg	neg	neg	neg	neg		hanseníase	não	negativa
8	lesões sarcoidicas na região malar	lupus vulgar x sarcoidose	dcg	neg	neg	pos	neg	pos	<i>M. avium</i>	sarcoidose – linfonodos mediastinais e nódulos faríngeanos, respondendo ao tratamento com corticóide	não	negativa
9	lesões nodulares nos membros inferiores	eritema indurado de Bazin	dcg com necrose caseosa	neg	pos	pos	neg	pos	<i>M. avium</i>	eritema indurado de Bazin-resposta ao esquema tríplice	não	positiva
10	nódulo infiltrado lóbulo orelha	micobacteriose atípica x leishmaniose x hanseníase	dcg	neg	neg	neg	neg	neg		leishmaniose	não	negativa
11	A - abscesso no braço direito	micobacteriose atípica	A-dcg com focos de necrose caseosa	neg	neg	pos	<i>M. tuberculosis complex</i>	neg		tuberculose cutânea com resposta ao esquema tríplice	lupus eritematoso sistêmico, em tratamento com methotrexate, cloroquina e prednisona	positiva
	B- placa infiltrada na região dorsal		B-dcg	neg	neg	...	<i>M. tuberculosis complex</i>	pos	<i>M. tuberculosis</i>			

continua

continuação

paciente	Quadro clínico	Diagnóstico inicial	AP	BAAR	IHQ	PPD	cultura	PCR	espécie	evolução clínica ou conclusão diagnóstica	doença associada	paciente
12	lesão verrucosa de dedo	tuberculose verrucosa x leishmaniose x esporotricose	dcg com hiperplasia pseudo-epiteliomatosa	neg	neg	pos	neg	pos		tuberculose verrucosa com resposta ao esquema tríplice	não	positiva
13	placas infiltradas e nódulos disseminados	hanseníase x micobacteriose atípica	infiltrado inflamatório perivascular e perianexial com histiócitos vacuolizados	neg	neg	...	neg	neg		hanseníase	não	negativa
14	nódulos nos membros inferiores	eritema indurado de Bazin x micobacteriose atípica	dcg com necrose caseosa	neg	neg	pos	<i>M. tuberculosis</i> complex	pos	<i>M. tuberculosis</i>	eritema indurado de Bazin resposta a tratamento com esquema tríplice	não	positiva
15	lesões fistulosas	micobacteriose atípica x tuberculose gomosa	borda de fistula	neg	neg	neg	<i>M. peregrinum</i>	pos	<i>M. tuberculosis</i>	micobacteriose atípica- . Tratamento claritromicina e ofloxacina com resposta	HIV positivo	positiva
16	pápulas ulceradas nos braços e tronco	tubercúlida pápulo-necrótica	dcg que sugere tubercúlida	neg	neg	pos	neg	pos	<i>M. avium</i>	tubercúlida -resistente a esquema tríplice. Tratamento com esquema alternativo para tuberculose com resposta	quadro de tuberculose renal (micobacteriose renal?)	positiva
17	pápulas e pústulas nos membros inferiores	tubercúlida pápulo necrótica	dcg	neg	neg	neg	neg	neg		Infecção estafilocócica-remissão do quadro com tratamento com antibiótico	não	negativa
18	lesão verrucosa coxa direita	leishmaniose x esporotricose x tuberculose verrucosa	dcg com focos de necrose	neg	pos	neg	neg	neg		leishmaniose	não	negativa

continua

continuação

paciente	Quadro clínico	Diagnóstico inicial	AP	BAAR	IHQ	PPD	cultura	PCR	espécie	evolução clínica ou conclusão diagnóstica	doença associada	paciente
19	placas liquenóides e infiltradas no dorso e braços	micobacteriose atípica	dermatite liquenóide de interface perineural e perianexial	neg	pos	neg	neg	pos	<i>M. chelonae</i>	micobacteriose atípica - tratamento com claritromicina , etambutol e prednisona com resposta	emagrecimento/ anemia	positiva
20	placas liquenóides ulceradas	tuberculíde pápulo necrótica x micobacteriose atípica	dcg	neg	neg	neg	neg	neg		sarcoidose - respondendo a corticoterapia	não	negativa
21	placas verrucosas nos membros inferiores	tuberculose verrucosa x leishmaniose x esporotricose	processo inflamatório crônico supurativo com fibrose	neg	neg	neg	neg	neg		esporotricose	não	negativa
22	úlceras antebraço	micobacteriose atípica	dcg	neg	neg	...	...	neg		granuloma corpo estranho	não	negativa
23	lesão verrucosa	leishmaniose x esporotricose x tuberculose	dcg com plasmócitos	neg	neg	neg	neg	pos	<i>M. avium</i>	leishmaniose	não	negativa
24	nódulos infiltrados múltiplos	tuberculose X sarcoidose	compatível com amiloidose	neg	neg	...	neg	neg		amiloidose primária sistêmica	não	negativa
25	nódulos ulcerados disseminados	micobacteriose atípica x quadro infeccioso	paniculite necrotizante com vasculite trombosante	neg	neg	...	neg	pos	<i>M. tuberculosis</i>	tuberculose gomosa e escrofuloderma - início tratamento com resposta ao esquema triplice, evoluiu com morte por choque séptico	transplante renal, tratamento com imunossupressor	positiva
26	pápulas e placas na face	lupus vulgar	dcg	neg	neg	pos	neg	pos	<i>M. tuberculosis</i>	lupus vulgar - tratamento com esquema triplice com resposta	não	positiva

continua

conclusão

paciente	Quadro clínico	Diagnóstico inicial	AP	BAAR	IHQ	PPD	cultura	PCR	espécie	evolução clínica ou conclusão diagnóstica	doença associada	paciente
27	lesões verrucosas	tuberculose verrucosa x leishmaniose x esporotricose	dcg com hiperplasia pseudo-epiteliomatosa	neg	neg	neg	neg	neg		leishmaniose	não	negativa
28	foliculite disseminada	micobacteriose atípica x foliculite eosinofílica	foliculite eosinofílica	neg	neg	...	neg	neg		foliculite eosinofílica de doente de SIDA	HIV positivo	negativa
29	lesões nodulares nos membros inferiores	eritema indurado de Bazin	linfoma anaplásico de células angiocêntricas	neg	neg	...	neg	neg		linfoma	HIV positivo	negativa
30	placas infiltradas e nódulos disseminados	micobacteriose atípica x hanseníase	processo inflamatório macrofágico com histiócitos xantomizados	pos	neg	...	...	neg		hanseníase	não	negativa
31	placas infiltradas na face e atrofia de lábio e narina	tuberculose x leishmaniose	dcg	neg	neg	neg	neg	pos		tuberculose cutânea x micobacteriose atípica-tratamento com esquema tríplice e para micobacteriose atípica com melhora do quadro	não	positiva
32	A - placas infiltradas na mão	cancro tuberculoso x esporotricose x micobacteriose atípica	A-dcg	neg	neg	...	neg	pos		tuberculose cutânea-tratamento com esquema tríplice com resposta	não	positiva
	B- nódulos fistulizados na axila		B-dcg com necrose caseosa	neg	neg		<i>M. tuberculosis</i> complex	neg				

Legenda:

...-não realizado

neg-negativo

pos-positivo

dcg-dermatite crônica granulomatosa

AP- anátomo-patológico

As figuras 4 a 13 são de quadro clínico de pacientes do estudo.



**Figura 4 –** Paciente número 15  
Legenda – paciente portador de SIDA com lesões pápulo-crostosas no couro cabeludo com cultura positiva para *M. peregrinum* e PCR positiva para *M. tuberculosis*



**Figura 5 –** Paciente número 15  
Legenda – paciente portador de SIDA com lesão fistulosa na região inguinal direita com cultura positiva para *M. peregrinum* e PCR positiva para *M. tuberculosis*





**Figura 6 –** Paciente número 16

Legenda – paciente com lesões pápulo e nódulo crostosas no braço com cultura negativa e PCR positiva para *M. avium*



**Figura 7 –** Paciente número 25

Legenda – paciente transplantada renal com lesões fistulosas na axila direita, com cultura negativa e PCR positiva para *M. tuberculosis*



**Figura 8** – Paciente número 25

Legenda – paciente transplantada renal com nódulo-ulceradas no pescoço, com cultura negativa e PCR positiva para *M. tuberculosis*



**Figura 9** – Paciente número 25

Legenda – paciente transplantada renal com lesão ulcerada na região inguinal esquerda, com cultura negativa e PCR positiva para *M. tuberculosis*



**Figura 10** – Paciente número 6

Legenda – paciente com lesões papulosas na orelha esquerda, com cultura negativa e PCR positiva para micobactéria, porém, sem tipagem da espécie



**Figura 11** – Paciente número 31

Legenda – paciente com lesões infiltradas na narina esquerda com destruição parcial da narina esquerda e lábio superior esquerdo, com cultura negativa e PCR positiva para micobactéria, porém, sem tipagem da espécie



**Figura 12** – Paciente número 32

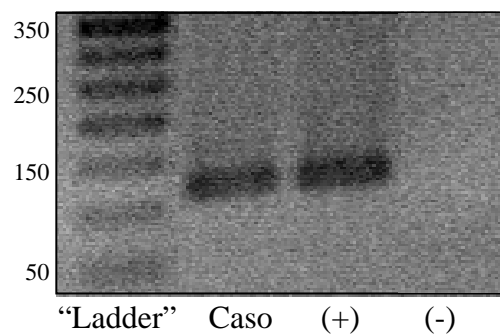
Legenda – paciente com lesão infiltrada no quarto dedo da mão esquerda, com cultura negativa e PCR positiva para micobactéria porém sem tipagem da espécie



**Figura 13** – Paciente número 32

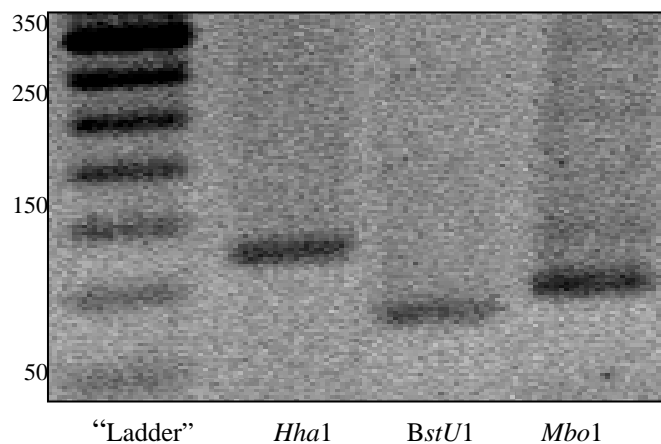
Legenda – paciente com lesão infiltrada e fistulizada na axila esquerda, com cultura positiva para *M. tuberculosis* e PCR negativa

As Figuras 14 a 19 referem-se aos resultados encontrados na PCR para micobactéria e pelo tratamento do produto final da PCR com enzimas de restrição para determinação da espécie em gel de agarose 2% e Nu Suiève 3%.



**Figura 14** – Resultado da PCR para detecção do gênero *Mycobacteria*

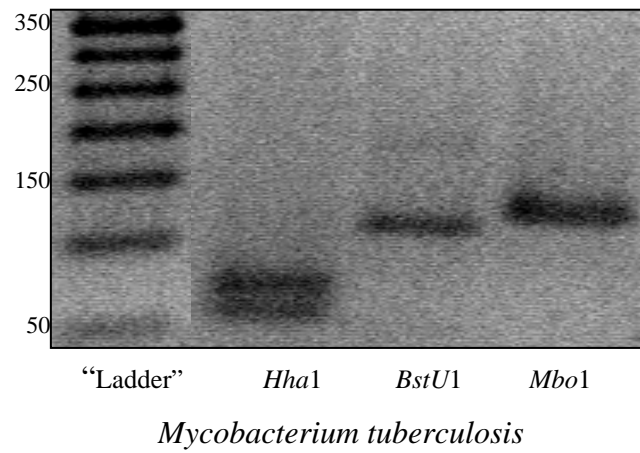
Legenda - +: controle positivo (*M. tuberculosis* de cultura); - controle negativo (água)



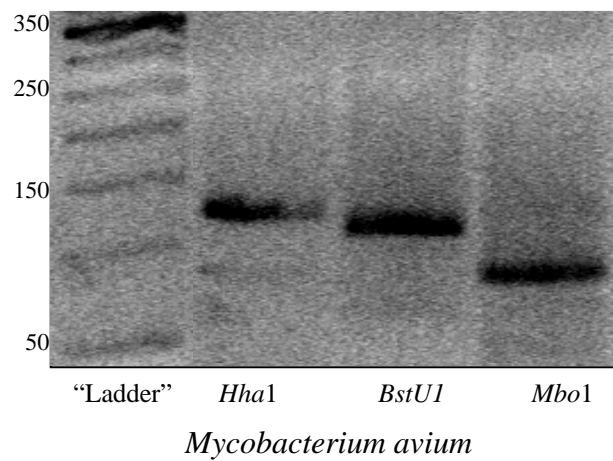
*M. gordonae* ou *M. chelonae* ou *M. marinum* ou *M. terrae*

**Figura 15** – Identificação de *M. gordonae* ou *M. chelonae* ou *M. marinum* ou *M. terrae* por enzima de restrição

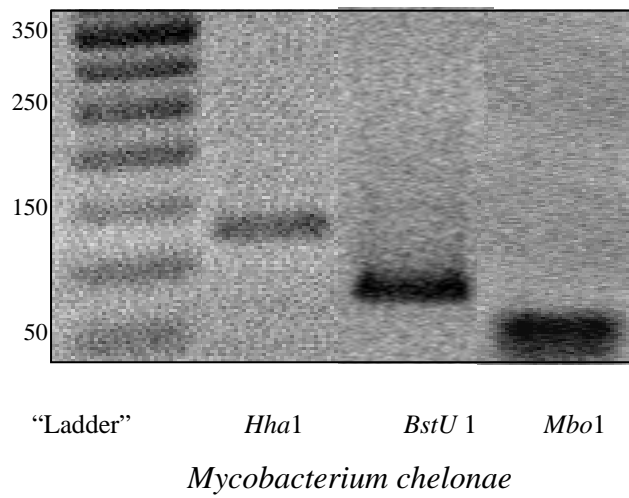
Hha1, Mbo1 e BstU1 – enzimas de restrição



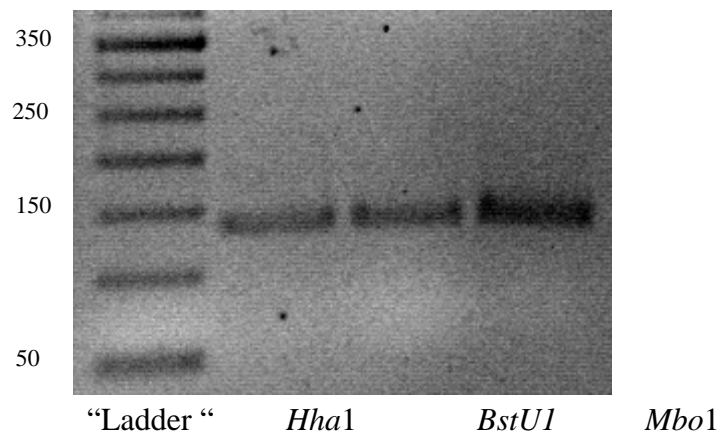
**Figura 16** – Identificação de *M. tuberculosis* por enzima de restrição  
Hha1, Mbo1 e BstU1 – enzimas de restrição



**Figura 17** – Identificação de *M. avium* por enzima de restrição  
Hha1, Mbo 1 e BstU1 – enzimas de restrição



**Figura 18** – Identificação de *M. chelonae* por enzima de restrição Hha1, Mbo1 e BstU1 – enzimas de restrição



Micobactéria que não apresentou cortes compatíveis com a leitura de algoritmo, após tratamento com as enzimas de restrição

**Figura 19** – Micobacteria que não é identificada através de corte pelas enzimas de restrição Hha1, Mbo 1 e BstU1 – enzimas de restrição

### 5.3 Tabelas para análise estatística

**Tabela 1-** Evolução clínica X PCR (número de amostras = 34)

	EV+	EV-
PCR+	14	3
PCR-	2	15

Legenda

EV+ (evolução clínica para tuberculose ou micobacteriose atípica)

EV- (não evolução para tuberculose ou micobacteriose atípica)

PCR+(PCR positiva)

PCR- (PCR negativa)

**Tabela 2 -** Evolução clínica X cultura (número de amostras = 31)

	EV+	EV-
cultura+	5	0
cultura -	11	15

Legenda

EV+ (evolução clínica para tuberculose ou micobacteriose atípica)

EV- (não evolução para tuberculose ou micobacteriose atípica)

cultura + (cultura positiva)

cultura -(cultura negativa)



**Tabela 3 -** Evolução clínica X imunohistoquímica (número de amostras = 34)

	EV+	EV-
IHQ+	3	2
IHQ-	13	16

## Legenda

EV+ (evolução clínica para tuberculose ou micobacteriose atípica)

EV- (não evolução para tuberculose ou micobacteriose atípica)

IHQ+ (imunohistoquímica positiva)

IHQ- (imunohistoquímica negativa)

**Tabela 4 -** Evolução clínica X PPD (número de pacientes = 24)

	EV+	EV-
PPD +	8	1
PPD -	4	11

## Legenda

EV+ (evolução clínica para tuberculose ou micobacteriose atípica)

EV- (não evolução para tuberculose ou micobacteriose atípica)

PPD+ (PPD positivo)

PPD- (PPD negativo)

**Tabela 5 -** Evolução clínica X pesquisa de BAAR (número de amostras = 34)

	EV+	EV-
BAAR +	0	1
BAAR -	16	17

## Legenda

EV+ (evolução clínica para tuberculose ou micobacteriose atípica)

EV- (não evolução para tuberculose ou micobacteriose atípica)

BAAR+ (pesquisa de BAAR positiva)

BAAR- (pesquisa de BAAR negativa)

**Tabela 6** - Evolução clínica X dermatite crônica granulomatosa (número de amostras = 34)

	EV+	EV-
DCG +	12	12
DCG -	4	6

## Legenda

EV+ (evolução clínica para tuberculose ou micobacteriose atípica)

EV- (não evolução para tuberculose ou micobacteriose atípica)

DCG+ (presença de dermatite crônica granulomatosa)

DCG- (ausência de dermatite crônica granulomatosa)

**Tabela 7** - Evolução clínica X dermatite crônica granulomatosa com necrose caseosa (número de amostras = 24)

	EV+	EV-
DCGNC +	6	0
DCGNC -	7	11

## Legenda

EV+ (evolução clínica para tuberculose ou micobacteriose atípica)

EV- (não evolução para tuberculose ou micobacteriose atípica)

DCGNC+ (presença de dermatite crônica granulomatosa com necrose caseosa)

DCGNC- (presença de dermatite crônica granulomatosa sem necrose caseosa)

**Tabela 8** - Evolução clínica X dermatite crônica granulomatosa com PCR+ / dermatite crônica granulomatosa com PCR - (número de amostras = 24)

	EV+	EV-
DCGPCR +	10	3
DCGPCR -	2	9

## Legenda

EV+ (evolução clínica para tuberculose ou micobacteriose atípica)

EV- (não evolução para tuberculose ou micobacteriose atípica)

DCGNCPCR+ (presença de dermatite crônica granulomatosa com PCR positiva)

DCGNCPCR- (presença de dermatite crônica granulomatosa com PCR negativa)

**Tabela 9** - Tabela geral de resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e concordância

avaliação	n	sens	esp	VPP	VPN	acur	p
EV X PCR	34	88%	83%	82%	88%	85%	0,655
EV X PPD	24	67%	92%	89%	73%	79%	0,179
EV X DCGPCR	24	83%	75%	77%	82%	79%	0,655
EV X DCGNC	24	46%	100%	100%	61%	71%	0,008
EV X cultura	31	31%	100%	100%	58%	65%	0,001
EV X IHQ	34	19%	89%	60%	55%	56%	0,005
EV X DCG	34	75%	33%	50%	60%	53%	0,046
EV X BAAR	34	0%	94%	0%	52%	50%	0

## Legenda

n-número de pacientes ou amostra

sens - sensibilidade

esp-especificidade

VPP - valor preditivo positivo

VPN - valor preditivo negativo

Acur - acurácia

p - teste de concordância de McNemar

DCG - dermatite crônica granulomatosa

DCGNCPCR - (dermatite crônica granulomatosa com PCR positiva)

DCGNC - (dermatite crônica granulomatosa com necrose caseosa)

IHQ - imunohistoquímica

## 6. Discussão

---

O ressurgimento da tuberculose, além do diagnóstico cada vez mais freqüente de infecção por outras micobactérias, sobretudo em indivíduos imunossuprimidos, gerou a necessidade de desenvolvimento e estudo de metodologias que permitissem diagnóstico mais sensível e, em especial, mais rápido para a instituição das terapias adequadas (Roth et al., 1997).

O diagnóstico precoce e o tratamento específico são métodos considerados eficazes para a redução da transmissão da doença (Degitz, 1996; Bollela et al., 1999; Tincopa - Wong, Morales, 1999; Ferreira et al., 2002; Ogusku et al., 2002; Barbagallo, et al., 2003; Chaisson, Nachege, 2003).

Freqüentemente, na prática dermatológica, depara-se com pacientes com suspeita clínica de tuberculose ou micobacterioses atípicas. Estas dermatoses têm uma heterogeneidade de apresentações clínicas, o que implica diagnóstico diferencial com outras doenças. Portanto, muitas vezes, é difícil distinguir, clinicamente, a tuberculose de outras doenças, inclusive de outros processos que se apresentam com dermatite granulomatosa ao exame histológico da pele (Gawkrodger, 1998; Rabinowitz, Zaim, 1996). Por este motivo, a realização de exames subsidiários é importante, porém nem sempre ajuda na elucidação do quadro (Kox, 1995; Roth et al., 1997).

O diagnóstico de tuberculose firma-se por meio do quadro clínico, epidemiologia e painel de exames como anátomo-patológico da pele com pesquisa de BAAR, identificação de bacilos por imunohistoquímica, cultura e teste tuberculínico.

Para este estudo, foram selecionados 220 blocos de parafina, porém a amplificação pelo gene constitutivo da beta actina, que confere um DNA de boa qualidade, só foi possível em 34 amostras de 32 pacientes.

Amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina são uma fonte importante para estudos retrospectivos, porém a extração de DNA de boa qualidade é, muitas vezes, problemática. Um fator importante que interfere na extração é a fixação em formol que pode formar ligações proteicas e ligações entre a proteína e o DNA, formando complexos de ligações covalentes. Estas ligações entre as moléculas dificultam a digestão das proteínas pela proteinase K. A manutenção do espécime por um período prolongado no formol predispõe a esta situação. Outro fator de influência é o pH, a preferência é pelo uso do formol tamponado, pois o formol não tamponado cria um meio ácido que pode degradar o DNA da amostra (Wu et al., 2002).

A qualidade do DNA em material fixado e emblocado em parafina pode sofrer interferência pela presença de fenóis, sais, EDTA, parafina e formalina. Até o ano de 2000, no Laboratório de Patologia do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, era utilizada a cera de abelha associada a parafina para confecção dos blocos. A partir de 2001, a cera de abelha não foi mais usada, esta cera é

rica em proteína e embora não haja referência na literatura, o excesso de proteína poderia dificultar a extração do DNA.

Outro fator de interferência na PCR é o tamanho do fragmento de DNA extraído da amostra. Amostras com menos de 300pb não são consideradas boas para amplificação pela PCR para micobactéria pelo método de Cook et al. (1994) pois na primeira etapa da PCR é necessária a amplificação de 231 e 310 pb. O exame que certifica que a amostra é viável para amplificação pelo protocolo de micobactéria, pelo tamanho do fragmento de DNA, é a PCR para o gene da beta actina. Desse modo, usa-se esta PCR como critério de inclusão para a análise.

O sucesso da amplificação do DNA de material fixado em formol e embocado em parafina também depende de vários fatores como tempo e modo de fixação, tempo de armazenamento e temperatura, métodos de coloração da lâmina e condições da amostra (Wu et al., 2002).

O exame anátomo-patológico foi realizado em todas as 34 amostras dos 32 pacientes. Dermatite crônica granulomatosa foi encontrada em 24 das 34 amostras (70,6%) sendo 22 dos 32 pacientes. Destes, em dez pacientes (12 amostras) a conclusão diagnóstica foi de tuberculose ou micobacteriose atípica. A sensibilidade do achado de dermatite crônica granulomatosa nos espécimes foi de 75% e a especificidade, de 33%. A acurácia foi de 53% ( $p= 0,046$ ), não mostrando concordância entre as variáveis.

Todos os casos de dermatite crônica granulomatosa com necrose caseosa evoluíram para tuberculose ou micobacteriose atípica, porém não houve concordância entre estas variáveis ( $p = 0,008$ ). As amostras com dermatite crônica granulomatosa e PCR positiva comparadas à evolução clínica, apresentaram sensibilidade de 83%, especificidade de 75% e acurácia de 79% com concordância entre as variáveis ( $p = 0,655$ ).

Na literatura, não há estudos que comparem a evolução ao exame anátomo-patológico exclusivamente. Existem trabalhos que comparam PCR com dermatite crônica granulomatosa da pele, assim Hisao et al., em 2003, encontraram 56,2% de positividade da PCR nas amostras estudadas, sendo diagnosticada tuberculose cutânea em 47% e micobacteriose atípica em 12,5%, sugerindo evolução clínica compatível. Li et al. verificaram 59% de positividade da PCR em vários tecidos com dermatite crônica granulomatosa, porém não acompanharam a evolução clínica (Li et al., 2000).

Para detecção de bacilos pela coloração para BAAR, tem-se limite de 5.000 -10.000 bactérias/ml (Kox, 1995; Bollela et al., 1999). A sensibilidade varia de acordo com a amostra e a micobactéria envolvida. Os melhores resultados são obtidos com amostras do trato respiratório, cuja sensibilidade é de 22%-78% e a especificidade de 100% (Kox, 1995; Ogusku et al., 2002). A baixa concentração de micobactérias na tuberculose cutânea, os métodos de fixação com formol e a confecção de blocos de parafina, fazem do método de coloração em material fixado, um exame de baixa sensibilidade (Ulukanligil et al., 2000; Ogusku et al., 2002).



No presente estudo, dentre todos os exames positivos detectados, a pesquisa de BAAR foi positiva em apenas um caso de hanseníase, demonstrando a mesma baixa sensibilidade relatada na literatura (Kox, 1995; Bollela et al., 1999; Ulukanligil et al., 2000; Ogusku et al., 2002). Na análise estatística, não houve concordância da pesquisa de bacilos em relação à evolução clínica ( $p = 0$ ).

O exame de imunohistoquímica com anti-BCG foi positivo em cinco das 34 amostras, e em duas amostras foi positivo, mas não houve comprovação da doença. Portanto, foi considerado falso positivo no paciente número quatro que teve o diagnóstico de sarcoidose e no paciente 18 que teve o diagnóstico de leishmaniose. Pode ter ocorrido reação cruzada com outras bactérias ou fungos, como descrito por Bonenberger et al. e Kutzner et al., porém, segundo a literatura, o anti-BCG não apresenta reação cruzada com a leishmania (Kutzner et al., 1998; Bonenberger et al., 2001).

No caso da sarcoidose, a etiopatogenia da doença por micobactéria é discutida, porém a amostra não mostrou positividade da PCR que poderia confirmar a presença de micobactéria. Os casos que tiveram o diagnóstico de tuberculose cutânea e micobacteriose atípica em que foi detectada a presença de micobactéria, com exame de imunohistoquímica negativo, são justificados pela distribuição irregular da micobactéria nas amostras, pelo baixo número de cepas presentes em amostras cutâneas e por problemas relacionados à fixação (Ogusku et al., 2002). Não houve concordância estatística entre as variáveis imunohistoquímica e evolução clínica ( $p=0,005$ ).

A cultura é considerada como padrão ouro no diagnóstico da tuberculose cutânea e micobacteriose atípica. É possível isolar a *M. tuberculosis* em amostras que contenham de dez a 100 bacilos (Bollela et al., 1999; Ogusku et al., 2002). A especificidade é de 100% e a sensibilidade chega a 90% para amostras de escarro (Bollela et al., 1999). Apesar da introdução das técnicas radiométricas na cultura para micobactérias e a combinação com procedimentos de hibridização, estas não são amplamente difundidas em nosso meio e o tempo necessário para identificação da *M. tuberculosis* é longo.

O diagnóstico da tuberculose e da micobacteriose atípica é realizado por meio da identificação do bacilo, porém, o achado dos bacilos é raro nos casos de micobacteriose cutânea (Kox, 1995; Roth et al., 1997; Degitz, 1996; Ogusku et al., 2002; Senturk et al., 2002).

Nas tuberculídes, em que raramente se observa bacilo, o diagnóstico torna-se mais difícil e controverso (Faizal et al., 1996; Quiros et al., 2000,). Em razão da dificuldade de identificação, muitos casos não são diagnosticados (Schneider et al., 1995).

No presente estudo, a cultura identificou quatro *M. tuberculosis* complex e uma *M. peregrinum*. O baixo número de resultados positivos da cultura pode estar relacionado ao número de bacilos presentes na amostra (formas paucibacilares), além de limitações intrínsecas do próprio cultivo (Degitz, 1996; Kox, 1995; Roth et al., 1997; Bollela et al., 1999; Ogusku et al., 2002; Senturk et al., 2002). Observa-se que, além da identificação da *M. peregrinum*, não foi possível isolar outras micobactérias atípicas por cultura.

A positividade da cultura foi de 16%, não tendo sido avaliada em três pacientes por problemas técnicos. A especificidade foi de 100%, pois todos os casos positivos evoluíram para doença. Sua sensibilidade foi de 31%, porém não houve concordância entre as variáveis cultura e evolução clínica ( $p = 0,001$ ). Na literatura, são encontrados relatos como o de Pasqualotto et al. que, em 1.241 amostras de diversos tecidos com BAAR positivo, a cultura só foi positiva em 53% dos casos (Pasqualotto et al., 2003).

O PPD foi positivo em nove pacientes, e oito tiveram confirmação diagnóstica de tuberculose cutânea e micobacteriose atípica. Todos os pacientes com PPD positivo que evoluíram para doença, apresentaram nódulo maior de 10 mm. Apenas o doente número oito, que embora tenha apresentado PPD positivo e a PCR positiva para *M. avium* teve seu diagnóstico firmado como sarcoidose. Embora com PPD positivo, apresentou ao exame de tomografia computadorizada, linfonodos mediastinais com padrão em mosaico e está respondendo ao tratamento com corticóide.

A literatura relata ocorrência de 25% de PPD falso negativo durante a avaliação inicial de pacientes com tuberculose e positividade por reação cruzada com outras micobactérias, porém com menor grau de reatividade à leitura (American Thoracic Society, 2000). No presente trabalho, foram encontrados quatro pacientes (16%) com PPD negativo que evoluíram para tuberculose ou micobacteriose atípica: caso três com eritema nodoso e PCR positiva sem espécie identificada, porém com resposta a tratamento específico; caso 15 de paciente HIV positivo, cuja cultura isolou *M.*

*peregrinum* e a PCR identificou *M. tuberculosis*; caso 19 com identificação de *M. chelonae*, mas paciente com provável quadro de imunossupressão com perda de peso, anemia e lesões disseminadas; caso 31 com PCR positiva para micobactéria sem identificação da espécie, porém com resposta a tratamento clássico e para micobactéria atípica.

A especificidade do PPD foi de 92%. A especificidade do teste tuberculínico é alta em populações com alta incidência da doença, em que chega a ser de 99% (American Thoracic Society, 2000). Houve correlação entre as variáveis PPD e evolução clínica ( $p = 0,179$ ).

Na última década, os métodos de biologia molecular transformaram a investigação diagnóstica da tuberculose. Métodos rápidos com várias seqüências-alvo foram descritos (Telenti et al., 1993; Cook et al., 1994; Kox, 1995; Richter et al., 1995; Degitz, 1996; Roth et al., 1997; Chuang et al., 1997; Tan et al., 1999; Quiros et al., 2000; Ena et al., 2001; Tan et al., 2001; Ogusku et al., 2002; Senturk et al., 2002; Hsiao et al., 2003; Honoré-Boukaline et al., 2003). Embora a PCR pareça ser um método promissor, seu papel na rotina diagnóstica para tuberculose cutânea e micobacteriose atípica da pele ainda não está bem estabelecido.

A PCR apresenta vantagens como sensibilidade, rapidez e possibilidade de execução de várias amostras ao mesmo tempo, estimulando o uso da técnica. A primeira desvantagem é a complexidade operacional, com necessidade de pessoal treinado e laboratório equipado, além do custo do exame.

Estudo multicêntrico cego para investigar a detecção de DNA de *M. tuberculosis* em escarro e saliva apresentou resultados muito diferentes de sensibilidade e especificidade, demonstrando que, embora tenha conceito simples, a PCR é técnica de difícil execução e susceptível a vários erros (Kox, 1995).

Com relação às características do método, várias etapas são necessárias, em todas elas é importante garantir a qualidade: conservação da amostra, método de extração do DNA, não contaminação e amplificação. Qualquer erro ou perda de qualidade do DNA prejudica os resultados (falso-positivo e falso-negativo). O uso de controles internos positivos e negativos é fundamental, além do controle de qualidade do DNA por PCR de gene constitutivo (beta actina ou beta globina). Além dos elementos primordiais para qualidade de qualquer exame de PCR, a característica peculiar das micobactérias, pela presença da parede glicoproteica e distribuição irregular na amostra, também impacta em resultados falso-negativos (Kox et al., 1995; Roth et al., 1997).

O desejo de se obter diagnóstico precoce, sensível e específico, sobretudo nas formas cutâneas, nas quais os outros métodos são pouco sensíveis, fez com que se estudasse o valor dos métodos de amplificação de gene de seqüência-alvo, dentre eles a PCR, que nas formas pulmonares da doença já é método estabelecido (Kox, 1995). Além disso, dependendo dos iniciadores utilizados, a PCR pode diferenciar a tuberculose de outras micobacterioses, o que às vezes é impossível com os outros métodos laboratoriais disponíveis (Telenti et al., 1993; Cook et al., 1994).

A primeira etapa consistiu na escolha de um protocolo que contemplasse o diagnóstico de tuberculose cutânea e micobacteriose atípica. Optou-se pelo protocolo de Cook e colaboradores, em que, no qual por meio da PCR poder-se-ia detectar a presença do gênero *Mycobacterium*, e pelo tratamento com enzimas de restrição, chegar à detecção da espécie (Cook et al., 1994).

A primeira tentativa de estudo que utilizou o material de arquivo parafinado foi frustrante e nos guiou para fazer o desenho do estudo.

Baseado nos relatos que a cultura, tanto para micobactérias atípicas como para *M. tuberculosis* é considerada padrão-ouro, não apresenta a positividade esperada (Chemal, Portaels, 2003; Aziz et al., 2004; Heifts, 2004) e a sugestão dos autores como Tan et al. (Tan et al., 1999; Tan et al. 2001) é que, quando os critérios diagnósticos não estiverem bem estabelecidos, a boa resposta terapêutica poderá comprovar o diagnóstico; utiliza-se a evolução da doença como parâmetro de referência. Por esse motivos, no presente estudo as análises de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia foram calculadas de forma diferente da literatura, pois utilizou-se, como padrão de referência, a evolução clínica e não o resultado da cultura. Tan et al. realizaram estudo em material parafinado, arquivado entre 1984 e 1999, de pacientes com tuberculose cutânea e tuberculoides por meio de protocolo de amplificação do gene IS 6110, comparado à cultura e diagnóstico final por acompanhamento clínico (Tan et al., 2001).

No presente estudo, foram avaliados 32 pacientes com suspeita clínica de tuberculose cutânea ou micobacteriose atípica com 34 amostras

(pacientes nº 11 e nº 32 com duas amostras respectivamente). Dos pacientes com suspeita clínica de tuberculose cutânea e micobacteriose atípica, 44% apresentaram diagnóstico confirmado por sua resposta terapêutica.

Outro dado importante no diagnóstico é o achado anátomo-patológico de dermatite crônica granulomatosa. Segundo Hsiao et al., a alta incidência de positividade (47%) da PCR nas dermatites crônicas granulomatosas é um alerta para a investigação completa desses casos (Hsiao et al., 2003). No estudo de Hsiao et al., foram incluídas 38 amostras de 36 pacientes com dermatite crônica granulomatosa, sendo realizada PCR baseada na seqüência do gene IS 6110 para detecção de *M. tuberculosis* e 16S r RNA para detecção de micobactérias. Os autores encontraram 18 amostras positivas para PCR baseadas na seqüência no gene IS 6110 e gene 16S r RNA, evidenciando detecção de seqüência de *M. tuberculosis*, além de quatro amostras positivas só para seqüência do gene 16S r RNA, mostrando presença de gene de micobactérias classificadas como atípicas.

No presente estudo, das 24 amostras com dermatite crônica granulomatosa, a PCR foi positiva em 13 amostras (54%), porém três pacientes não tiveram diagnóstico final de tuberculose cutânea ou micobacteriose atípica. Dois doentes, cujo exame anátomo-patológico demonstrou dermatite crônica granulomatosa com a PCR negativa, tiveram diagnóstico final de tuberculose cutânea ou micobacteriose atípica. Portanto foram encontradas três amostras falsos-positivas e duas amostras falsos-negativas. A amostra positiva apresentou dermatite crônica granulomatosa e

PCR positiva, detectou-se a presença de *M. chelonae* ou *M. marinum* ou *M. terrae* ou *M. goodii*. Observou-se que se a micobactéria presente for mesmo a *M. terrae* poderá ser considerada como contaminante ou poderá haver a presença de micobactéria atípica sem haver doença pois o diagnóstico final foi de leishmaniose. A amostra nº oito apresentou situação semelhante com a detecção de *M. avium*, porém o doente mostrou diagnóstico final de sarcoidose. A literatura apresenta relatos da relação entre sarcoidose e micobacteriose (Deigitz, 1996). A amostra nº 23 apresentou PCR positiva para *M. avium*, porém o doente teve o diagnóstico de leishmaniose, mas a *M. avium* pode estar presente colonizando a pele sem causar doença (Taippeiner, Wolf, 1993).

Com relação aos achados da PCR e cultura, houve amostras (nº 11 A e nº 32 B) que apresentaram PCR negativa e a cultura foi positiva para *M. tuberculosis*. Ressalta-se que estas amostras mostravam supuração. A literatura refere que o pus pode ser um fator de interferência na PCR (Roth et al., 1997).

Na amostra nº 15, houve diferença entre a identificação por cultura que revelou *M. peregrinum* e a PCR, *M. tuberculosis*. A *M. peregrinum* que é um subtipo da *M. fortuitum* (Pagnoux et al., 1998). Salienta-se que o doente teve resposta terapêutica compatível com micobacteriose atípica. Quando se verificou o algoritmo de leitura, observou-se que a *M. tuberculosis* e *M. fortuitum* são diferenciadas apenas na última etapa com o corte pela enzima Mb0 1. Pode ter ocorrido falha no tratamento por esta enzima ou



polimorfismo desse subtipo que não foi contemplado pelo protocolo, apresentando corte diferente pela enzima e sendo lido como *M. tuberculosis*.

Quanto à identificação das micobactérias pela PCR no presente estudo, foram identificadas seis *M. tuberculosis*, quatro *M. avium*, uma *M. chelonae* e uma *M. chelonae* ou *M. marinum* ou *M. terrae* ou *M. gordonae* (paciente nº um) e cinco micobactérias que não foram tipadas (identificadas a espécie) por problemas na leitura do algoritmo após digestão pelas enzimas de restrição. A PCR identificou no paciente nº um *M. chelonae* ou *M. marinum* ou *M. terrae* ou *M. gordonae*. A *M. terrae* não é considerada patogênica ou, possivelmente, patogênica, *M. chelonae* ou *M. marinum* ou *M. gordonae* podem estar presentes sem causar infecção. Em cinco micobactérias, não foi possível a identificação da espécie e poderia se correr o risco de erro se este dado como positivo não fosse incluído.

Outra observação interessante é que, no protocolo, nenhum caso de hanseníase apresentou PCR positiva, embora tenha sido descrito por Cook et al. que a dificuldade de determinação da espécie, pelas enzimas de restrição, pode indicar tratar-se de seqüência de DNA de *M. leprae* (Cook et al., 1994).

Das cinco amostras em que não foi possível determinar a espécie pelo tratamento com enzimas de restrição, o doente nº três foi diagnosticado como eritema nodoso por tuberculose e respondeu com melhora ao tratamento clássico. O doente nº seis foi tratado como tuberculose clássica, porém, após resposta ao tratamento apresentou recidiva do quadro e foi introduzida terapêutica com claritromicina com resposta. O doente nº 12

desenvolveu tuberculose verrucosa com resposta ao esquema tríplice. O doente nº 31 apresentou também resposta ao esquema tríplice para tuberculose associado ao de micobacteriose atípica e o doente nº 32 apresentou cultura positiva para *M. tuberculosis*, com tratamento com esquema tríplice com melhora.

Dos quatorze pacientes concluiu-se pelo diagnóstico final de tuberculose cutânea ou micobacteriose atípica, seis pacientes apresentaram diagnóstico final de tuberculíde (42%), três de eritema indurado de Bazin (nº cinco, nº nove e nº 14), dois de tuberculíde pápulo necrótica (pacientes nº seis e nº 16) e um de eritema nodoso (paciente nº 3). A PCR foi positiva nos seis pacientes com identificação de duas *M. tuberculosis*, duas *M. avium* e duas micobactérias nas quais não foi possível a tipagem. A cultura foi positiva apenas em um doente (*M. tuberculosis* no paciente nº 14). O teste tuberculínico foi positivo em cinco pacientes, sendo negativo apenas no paciente nº três. As tuberculídes são um grupo de afecções que resultam de disseminação hematogênica de antígenos da micobactéria que causam uma reação de hipersensibilidade.

A dificuldade de se identificar o foco primário, de identificação da micobactéria por cultura e a evolução em surtos, leva ao questionamento da micobactéria como fator causal. A PCR contribuiu sobremaneira para a identificação molecular da micobactéria e para estabelecer a correlação entre as tuberculídes e a infecção por micobactérias (Chuang et al., 1997).

Nos pacientes estudados a PCR mostrou-se importante para se estabelecer a relação entre infecção por micobactéria e tuberculíde. Em dois

pacientes a tuberculose estava relacionada com a infecção por *M. avium*. Há descrição de tuberculose do tipo líquen escrofuloso associado à infecção por *M. avium* detectada por PCR (Komatsu et al., 1999).

Outro aspecto interessante é que a literatura questiona o valor da PCR para a detecção de *M. tuberculosis* em pacientes vacinados com BCG (Senturk et al., 2002).

Em nosso meio, a população recebe vacina de rotina desde 1976 e não se encontrou presença de seqüência de DNA do complexo *M. tuberculosis* nos pacientes nº 10 e nº 17 que, provavelmente, foram vacinados, pois nasceram após a instituição da obrigatoriedade da vacinação em crianças com menos de um ano de idade.

A PCR tem limitações de sensibilidade tanto por falta como por excesso de DNA. Ogusku et al. relatam que resultado falso-negativo da PCR pode estar relacionado com a diluição do DNA. No presente estudo, não se tituló a quantidade de DNA na amostra (Ogusku et al., 2002). Nas duas amostras com PCR negativa, houve a presença de pus como fator inibidor.

A sensibilidade geral da PCR, em amostras com baciloscopia negativa, é de 50% a 72% em diferentes estudos com o emprego dos iniciadores baseados na seqüência IS 6110 (Tan et al., 1999; Hisao et al., 2003). Outro aspecto importante é o tipo de protocolo usado; Tan et al. fizeram dois estudos de PCR com a mesma seqüência-alvo IS 6110 e observaram que, com a mudança no protocolo por meio de “nested” PCR,

aumentou a sensibilidade diagnóstica (Tan et al., 1999; Tan et al., 2001). O protocolo que foi utilizado também foi de “nested” PCR (Cook et al., 1994).

A PCR comparada à evolução clínica no presente estudo, apresentou sensibilidade de 88%, especificidade de 83%, VPP de 82%, VPN de 88% e acurácia de 85%. Estes dados mostram a superioridade desta técnica para a detecção de doença em relação ao painel de exames.

O teste de McNemar mostrou concordância entre as variáveis ( $p = 0,655$ ). O segundo exame de maior acurácia é o PPD (79% e  $p = 0,179$ ), porém o exame positivo não diferencia tuberculose cutânea de infecção por micobactéria atípica nem diferencia contato de infecção ativa. Nos pacientes portadores de dermatite crônica granulomatosa com PCR e evolução clínica positiva, a acurácia foi também de 79% ( $p = 0,655$ ).

O único trabalho comparável na literatura com relação à PCR foi o de Tan et al. (Tan et al., 2001). Os autores usaram a PCR baseada na seqüência IS 6110 e utilizaram como parâmetro a evolução clínica (TAN et al., 2001). Neste trabalho, a sensibilidade e a especificidade foram de 100% em pacientes imunossuprimidos. Nas formas paucibacilares, a sensibilidade da PCR foi de 73%.

No presente estudo foram reunidas 34 amostras de 32 pacientes. O número foi menor com relação ao estudo de Tan et al., porém obteve-se a concordância entre PCR e evolução clínica ( $p = 0,655$ ) e foram utilizados outros parâmetros de correlação como a imunohistoquímica e o teste tuberculínico.

O diagnóstico e a identificação de *M. tuberculosis* e micobactérias atípicas ainda é tarefa difícil. Segundo Chong et al., em estudo retrospectivo de dez anos em Hong Kong, o maior número de casos encontrados relacionados à tuberculose foi o de eritema indurado de Bazin (79,5%), mostrando uma tendência de maior número de paucibacilares (Chong, Lo, 1995). Observa-se que os testes intradérmicos não distinguem doença ativa de infecção passada. A cultura é o exame laboratorial mais importante, porém, em algumas formas, de tuberculose e micobacterioses, pode ser negativa.

Em estudo retrospectivo de cultura para micobactérias de 1.241 amostras de diferentes tecidos com BAAR positivo, só 53,8% foram positivas (Pasqualotto et al., 2003).

A literatura relata a maior sensibilidade da PCR comparada à cultura, mas também descreve a presença de DNA de *M. tuberculosis* e micobactérias atípicas em pele sã (Teippeiner, Wolf, 1993).

Existem vários relatos de detecção de DNA de *M. tuberculosis* em lesões de sarcoidose. A doença pode ser interpretada como reação crônica a estímulo antigênico persistente (Deigitz et al., 1996). A micobactéria, especialmente a *M. tuberculosis*, é considerada como causadora da sarcoidose por alguns autores em razão da similaridade clínico patológica e por causa dos métodos de biologia molecular que proporcionaram a detecção de DNA de micobactéria nessas lesões (Deigitz et al., 1996).

O DNA da *M. paratuberculosis*, micobactéria que também já foi descrita na doença de Crohn, foi demonstrado também em lesões de sarcoidose. A análise dos estudos de detecção de DNA de micobactéria em sarcoidose ainda é controversa e, para muitos autores, não indica ainda a micobactéria como agente causal da doença (Ryan et al., 1996).

A micobactéria atípica é uma bactéria saprofítica e não é patógeno obrigatório. A PCR foi positiva e a identificação da espécie nos pacientes nº um, nº oito e nº 23 revelaram a presença de micobactérias atípicas em amostras de pacientes que não apresentaram diagnóstico final de tuberculose cutânea ou micobacteriose atípica, podendo demonstrar infecção ou contaminação sem doença.

Analisando todas as características do método, a PCR deve ser interpretada cuidadosamente à luz do quadro clínico e outros exames complementares. A validade do método e sua padronização continuam ainda em discussão na literatura, sobretudo nas amostras extrapulmonares (Kox, 1995; Degitz, 1996; Roth et al., 1997; Bollela et al., 1999; Senturk et al., 2002; Ogusku et al., 2002).

A PCR pode ser a única ferramenta no diagnóstico da tuberculose e micobacteriose atípica, em especial nos casos paucibacilares. É importante em casos graves de pacientes imunossuprimidos onde a decisão terapêutica deve ser rápida e em países, como o Brasil, onde é alta a prevalência da doença.

Neste estudo, a PCR demonstrou ser o melhor exame para diagnóstico da tuberculose cutânea e micobacteriose atípica e deve ser um método disponível em centros de referência que tratam tuberculose cutânea e micobacteriose atípica.

## 7. Conclusões

---



Com base nos resultados pode-se concluir que comparada à evolução clínica:

- A PCR é o exame de maior acurácia diagnóstica do painel de exames utilizados
- A PCR apresenta alta sensibilidade e maior VPN
- O PPD é o segundo exame de maior acurácia para triagem dos pacientes com possível doença
- A presença de dermatite crônica granulomatosa com PCR positiva é também o segundo resultado de maior acurácia
- A cultura apresenta maior especificidade e VPP
- A pesquisa de BAAR e a imunohistoquímica foram exames que não apresentaram concordância com a evolução clínica.
- A PCR é método de escolha para diagnosticar mais precocemente a tuberculose cutânea e micobacteriose atípica

## 8. Referências

---

Aggarwal A, Guglani L, Faridi MM. Standardization of Mantoux test. *Indian Pediatr* 2002; 39:404-6.

Barbagallo J, Tager P, Ingleton R, Hirsch RJ, Weinberg JM. Cutaneous tuberculosis: diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3:319-28.

Baselga E, Margall N, Barnadas MA, Coll P, de Moragas JM. Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in lobular granulomatous panniculitis (erythema induratum-nodular vasculitis). *Arch Dermatol* 1997; 133:457-62.

Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: EDUSP; 1076. p.157.

Beutner EH. Tuberculosis of the skin: historical perspectives on tuberculin and Bacille Calmette Guerin. *Int J Dermatol* 1997; 36:73-7.

Bollela VR, Sato DN, Fonseca BA. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Rev Saúde Pública* 1999; 33:281-6.

Bonenberger TE, Ihrke PJ, Naydan DK, Affolter VK. Rapid identification of tissue micro-organisms in skin biopsy specimens from domestic animals using polyclonal BCG antibody. *Vet Dermatol* 2001; 12:41-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Casos novos de tuberculose por forma clínica e faixa etária: dados provisórios até junho/04. [citado 26 nov 2004]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/tb/tb\\_cn03.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/tb/tb_cn03.htm)

Chaisson RE, Nachega J. Bactéria - tuberculosis. In: Warrel da, Cox TM, Firth JD, Benz EJ, editors. *Oxford textbook of medicine*. 4<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 2003. p.1-42.

Chemlal K, Portaels F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:77-83.

Chong LY, Lo KK. Cutaneous tuberculosis in Hong Kong: a 10-year retrospective study. *Int J Dermatol* 1995; 34:26-9.

Chuang YH, Kuo TT, Wang CM, Wang CN, Wong WR, Chan HL. Simultaneous occurrence of papulonecrotic tuberculide and erythema induratum and the identification of Mycobacterium tuberculosis DNA by polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* 1997; 137:276-81.

Cook SM, Bartos RE, Pierson CL, Frank TS. Detection and characterization of atypical mycobacteria by the polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3:53-8.

Degitz K. Detection of mycobacterial DNA in the skin. Etiologic insights and diagnostic perspectives. *Arch Dermatol* 1996; 132:71-5.

Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376-95.

Ena P, Sechi LA, Saccabusi S, Molicotti P, Lorrai MP, Siddi M, Zanetti S. Rapid identification of cutaneous infections by nontubercular mycobacteria by polymerase chain reaction-restriction analysis length polymorphism of the hsp65 gene. *Int J Dermatol* 2001; 40:495-9.

Faizal M, Jimenez G, Burgos C, Del Portillo P, Romero RE, Patarroyo ME. Diagnosis of cutaneous tuberculosis by polymerase chain reaction using a species-specific gene. *Int J Dermatol* 1996; 35:185-8.

Fenniche S, Ben Jennet S, Marrak H, Khayat O, Zghal M, Ben Ayed M, Mokhtar I. Tuberculose cutanee: aspects anatomocliniques et evolutifs (26 cas). *Ann Dermatol Venereol* 2003; 130:1021-4.

Ferreira RM, Saad MH, Silva MG, Fonseca Lde 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; 97:725-9.

Fukunaga H, Murakami T, Gondo T, Sugi K, Ishihara T. Sensitivity of acid-fast staining for Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed tissue. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:994-7.

Gawkrodger DJ. Mycobacterial infections. In: Champion RH, Burton JL, Burn DA, Breathnach Sm, editors. Rook, Wilkinson, Ebling. *Textbook of dermatology*. 6<sup>a</sup> ed. London: Blackwell Science; 1998. p.1187-1203.

Heifeits L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin Respir Crit Care Med* 2004; 25:283-95.

Honoré-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2323-9.

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

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:577-80.

Komatsu H, Terunuma A, Tabata N, Tagami H. *Mycobacterium avium* infection of the skin associated with lichen scrofulosorum: report of three cases. *Br J Dermatol* 1999; 141:554-7.

Kox LF. Tests for detection and identification of mycobacteria. How should they be used? *Respir Med* 1995; 89:399

Kutzner H, Argenyi ZB, Requena L, Rutten A, Hugel H. A new application of BCG antibody for rapid screening of various tissue microorganisms. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38:56-60.

Li Jackson, Lo Stephen, Ng Chin-Sing. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Diagn Mol Pathol*. 2000;9(2):67-74.

Lodha R, Kabra SK. Newer diagnostic modalities for tuberculosis. *Indian J Pediatr* 2004; 71:221-7.

Margall N, Baselga E, Coll P, Barnadas MA, de Moragas JM, Prats G. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA by the polymerase chain reaction for rapid diagnosis of cutaneous tuberculosis. *Br J Dermatol* 1996; 135:231-6.

Médici AC. Globalização: doenças transmissíveis, desigualdade mundial. [citado 27 nov 2004]. Disponível em: <http://www.iadb.org/sds/doc/SOCEnfermedades Trasmisibles1.pdf>.

Ogusku MM, Sadahiro A, Hirata MH, Hirata RDC, Zaitz C, Salem JI. PCR in the diagnosis of cutaneous tuberculosis. *Braz J Microbiol* 2003; 34:165-70.

Palenque E. Skin disease and nontuberculous atypical mycobacteria. *Int J Dermatol* 2000; 39:659-66.

Pasqualotto ACR, Dornelles D, Pereira MCF, Targa-Ferreira RL, Santos BR. Retrospective study of 668 cultures for mycobacteria in a reference hospital for AIDS in Southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2003; 7:126-8.

Pauls RJ, Turenne CY, Wolfe JN, Kabani A. A high proportion of novel mycobacteria species identified by 16S rDNA analysis among slowly growing AccuProbe-negative strains in a clinical setting. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:560-6.

Perez, AR. Modification a la tecnica de Fite-Faraco para la coloracion de bacilos acido-alcohol resistentes en secciones histologicas. *Rev Latinoam Anat Patol* 1963; 15:81-5.

Quiros E, Bettinardi A, Quiros A, Piedrola G, Maroto MC. Detection of mycobacterial DNA in papulonecrotic tuberculid lesions by polymerase chain reaction. *J Clin Lab Anal* 2000;14:133-5.

Rabinowitz LO, Zaim MT. A clinicopathologic approach to granulomatous dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35:588-600.

Ramos-e-Silva M, Castro, MCR. Mycobacterial infections. In Bologna J, Jorizzo J, Rapini, RP, editores. *Dermatology*. London, Mosby (Elsevier Ltd.); 2003,p. 1145-1164.

Richter E, Schluter C, Duchrow M, Hahn M, Rusch-Gerdes S, Galle J, Flad HD, Gerdes J. An improved method for the species-specific assessment of mycobacteria in routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Pathol* 1995; 175:85-92.

Roth A, Schaberg T, Mauch H. Molecular diagnosis of tuberculosis: current clinical validity and future perspectives. *Eur Respir J* 1997; 10:1877-91.

Ryan P, Bennett MW, Aarons S, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, Shanahan F. PCR detection of Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut* 2002; 51:665-70.

Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia*. São Paulo. Artes Médicas;2001, p.453 -66: Tuberculose e micobacterioses atípicas.

Satta R, Cottoni F, Mollicotti P, Lissia A, Cerimele D. Cutaneous Mycobacterium chelonae infection in a presumably immunocompetent host. *Acta Derm Venereol* 2002; 82:156-7.

Satta R, Retanda G, Cottoni F. Mycobacterium avium complex: cutaneous infection in an immunocompetent host. *Acta Derm Venereol* 1999; 79:249-50.



Schneider JW, Jordaan HF, Geiger DH, Victor T, Van Helden PD, Rossouw DJ. Erythema induratum of Bazin. A clinicopathological study of 20 cases and detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in skin lesions by polymerase chain reaction. *Am J Dermatopathol* 1995;17:350-6.

Sehgal VN, Jain MK, Srivastava G. Changing pattern of cutaneous tuberculosis. A prospective study. *Int J Dermatol* 1989; 28:231-6.

Senturk N, Sahin S, Kocagoz T. Polymerase chain reaction in cutaneous tuberculosis: is it a reliable diagnostic method in paraffin-embedded tissues? *Int J Dermatol* 2002; 41:863-6.

Taippeiner G, Wolff K. Tuberculosis and other mycobacterial infections. In: Fitzpatrick TB, Eien AZ, Wolff k, editores. *Dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill; 1993. p.1933-50.

Tan SH, Tan BH, Goh CL, Tan KC, Tan MF, Ng WC, Tan WC. Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA using polymerase chain reaction in cutaneous tuberculosis and tuberculids. *Int J Dermatol* 1999; 38:122-7.

Tan SH, Tan HH, Sun YJ, Goh CL. Clinical utility of polymerase chain reaction in the detection of Mycobacterium tuberculosis in different types of cutaneous tuberculosis and tuberculids. *Ann Acad Med Singapore* 2001; 30:3-10.

Taylor, C R, Cote R J. Immunocitomicroscopy: a diagnostic tool for surgical pathologist. In: *Major problems in Pathology*. Pensilvanya: WB Saunders Company; 1994. p.421-3

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:175-8.

Thomas V, Anguita J, Barthold SW, Fikrig E. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme arthritis. *Infect Immun* 2001; 69:3359-71.

Tincopa Wong O, Jave Morales B. Tuberculosis cutánea: estudio clínico, anátomo-patológico y de frecuencia. *Dermatol. Peru* 1999; 9:10-8.

Ulukanligil M, Aslan G, Tasci S. A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95:855-8.

Wiley EL, Beck B, Freeman RG. Reactivity of fungal organisms in tissue sections using anti-mycobacteria antibodies. *J Cutan Pathol* 1991; 18:204-9.

Wright DK, Monos MM. *PCR protocols*. New York: Academic Press; 1990. p.153.

Wu L; Patten, NB S, Yamashiro, CT, Chui, BBS. Extraction and Amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Immunohistochem* 2002; 10(3), 269-74.