

ARTIGO DE REVISÃO

A infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas na infância: um desafio diagnóstico

Childhood Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacter: A challenge on the diagnosis

Adriana Antônia C. Furini^{1,2}; Heloisa S.P. Pedro³; Lilian Maria L. Montenegro⁴; Ricardo Luiz D. Machado⁵; Célia Franco⁶; Haiana C. Schindler⁴; Andrea Regina B. Rossit⁷

¹Mestre em Ciências da Saúde*; ²Professora Especialista do Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP; ³Pesquisadora do IAL; Setor de Micobactérias/ Instituto Adolfo Lutz; ⁴Pesquisador do CPqAM/Fio Cruz; Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife; ⁵Professora Doutora*; CIM; ⁶Médica Infectologista, Professora Doutora, DDIP/Fundação Faculdade Regional de Medicina; ⁷Professora Doutora, Instituto Biomédico; Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro

*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; FAMERP

Resumo **Objetivos:** Avaliar a tuberculose e micobacterioses na infância por meio de uma revisão bibliográfica criteriosa e crítica, com ênfase na epidemiologia, aspectos clínicos e ferramentas diagnósticas. **Métodos:** A pesquisa foi realizada nas bases de dados Lilacs, SciELO, PubMed, durante o período de 2000 a 2009. Quarenta e seis artigos foram considerados e onze diretrizes e manuais nacionais e internacionais. Os descritores utilizados foram: criança, infância, tuberculose, micobactérias atípicas, biologia molecular e diagnóstico. **Resultados:** As crianças portadoras da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* são consideradas por diversos autores como “órfãos da tuberculose”. Várias características dificultam o estabelecimento do diagnóstico definitivo da tuberculose e micobacterioses na infância, entre elas as clínicas com lesões não extensivas, o caráter paucibacilar, as formas latentes, a dificuldade de coleta de espécimes clínicos, as falhas das técnicas da baciloscopia e cultura e a prática rotineira dos países em desenvolvimento de investigar a etiologia tuberculosa após falência terapêutica para patógenos habituais. **Conclusões:** A detecção da micobactéria permanece como confirmação diagnóstica e a oportunidade de investigação do perfil de sensibilidade, favorecendo o tratamento efetivo para qualquer faixa etária independente de seu papel na transmissão da doença. Nesse cenário, assumem maior importância, novas estratégias diagnósticas, entre elas as técnicas de biologia molecular com a promessa de melhor sensibilidade, especificidade e pronta detecção.

Palavras-chave Biologia Molecular; Criança; Diagnóstico; Micobactérias Atípicas; Tuberculose.

Abstract **Objectives:** To evaluate the tuberculosis and mycobacteriosis in childhood by a careful and critical literature review, with emphasis on epidemiology, clinical features and diagnostic devices. **Methods:** The study was made based on the following databases: LILACS, SciELO and PubMed, between the period of 2000 to 2009. Forty-six papers and eleven national and international guidelines/manuals were considered. The keywords used were: child, childhood, tuberculosis, atypical mycobacteria, molecular biology and diagnosis. **Results:** Children infected by *Mycobacterium tuberculosis* were considered by several authors as “orphans of tuberculosis”. To define final diagnosis of tuberculosis and mycobacterial infections is difficult in childhood because of several characteristics such as: the clinical with nonextensive lesions, the paucibacillary nature, the latent forms, the difficulty of collecting clinical specimens, the failures of the smear and culture techniques and routine practice of developing countries to investigate the etiology of tuberculosis after therapeutical failures for usual pathogens. **Conclusions:** The detection of mycobacteria remains usual to confirm the diagnosis and the opportunity to investigate the sensitivity profile. This promotes effective treatment for all age groups independent of their role in the disease transmission. In this environment, new diagnostic strategies including the interferon-gamma dosage and the molecular biology techniques can provide better sensitivity, specificity and ready detection.

Keywords Molecular Biology; Child; Diagnosis; Mycobacteria Atypical; Tuberculosis.

Recebido em 14.07.2010
Aceito em 25.11.2010

Não há conflito de interesse

Epidemiologia da Tuberculose Infantil

A Organização Mundial de Saúde (OMS)¹ estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na forma latente.^{2,3,4} A cada ano, nove milhões de casos são notificados e, dois milhões desses morrem em decorrência da patologia.^{1,2,5,6} Dos nove milhões de casos estimados, aproximadamente um milhão ocorre em menores de 15 anos de idade e desses 75% ocorre em vinte e dois países em desenvolvimento que concentram 80% dos casos. No *ranking* da patologia, o Brasil ocupa a 14ª posição.^{1,6} No Brasil, em 2008 foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 81.660 casos de tuberculose, entre adultos e crianças.⁷

A população menor de 15 anos compõe 11% do total de casos notificados anualmente no mundo, sendo que 8 a 20% das mortes decorrentes de tuberculose ocorrem em crianças.¹ Quarenta por cento dos lactentes infectados, não tratados, evoluem para doença ativa em um a dois anos.⁸ Na faixa etária entre zero a 14 anos a incidência mundial da tuberculose foi de aproximadamente um milhão de casos até o início dos anos 2000. Contudo, convém salientar que os dados nessa faixa etária não são precisos, pois em 80% dos casos o exame de escarro é negativo.⁹ No Brasil, 15% dos casos notificados de tuberculose acometem menores de 15 anos de idade.³ Já no Estado de São Paulo, no ano de 2008, 578 casos foram notificados na faixa etária de zero a 14 anos. Enquanto 115 deles representam a manifestação pulmonar bacilífera, outros 123 também pulmonares tiveram baciloscopia negativa. Um número ainda maior (202 casos) de formas pulmonares teve diagnóstico exclusivamente clínico. Cento e vinte e cinco formas extrapulmonares da patologia foram relatadas no mesmo ano com 13 na forma meníngea.¹⁰ Enquanto a notificação da doença micobacteriana pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* é compulsória, por outro lado, no Brasil o contrário ocorre com as micobacterioses, o que dificulta a busca por registros oficiais com vistas à estimativa acurada das respectivas incidências. Quanto as MNT, protocolos oficiais para a notificação e para a conduta terapêutica no Brasil somente agora começam a ser disponibilizados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, que também elencou dez Centros de Referência Estaduais, para o tratamento desses agentes.¹¹

O Ministério da Saúde define os municípios como prioritários para o controle da tuberculose entre aqueles que representam 70% de concentração dos casos, totalizando 315 cidades.^{9,12} A cidade de São José do Rio Preto é responsável por quase 50% dos casos notificados na região Noroeste paulista, sendo considerada como prioritária no Programa de Controle da Tuberculose pela alta taxa de pacientes com tuberculose e exame sorológico positivo para o HIV.¹² Porém, as publicações sobre tuberculose e micobacterioses em crianças para essa região são escassas, e ainda, as dificuldades diagnósticas podem corroborar para subnotificação nesses indivíduos.

A tuberculose na infância

O *Mycobacterium tuberculosis*, descrito em 1888 por Robert Koch é o agente etiológico da grande maioria dos casos de

tuberculose, inclusive na infância.^{13,14} Representa um grande desafio à saúde pública no Brasil e em outros países em desenvolvimento, pois apesar do tratamento ser conhecido e amplamente disponível, a doença continua a apresentar dados epidemiológicos preocupantes.^{5,15} É um bacilo intracelular facultativo, aeróbio estrito, imóvel, e as propriedades peculiares de sua parede celular rica em ceras, álcool ácido resistência e sobrevivência aos germicidas e à dessecação.^{7,16} A primo-infecção pelo MT, em sua maioria assintomática, apresenta risco maior de ocorrer na infância, principalmente nas crianças de zero a quatro anos e nas imunocomprometidas.^{1,17} No contexto do controle epidemiológico, as crianças portadoras da tuberculose (TB) são paucibacilares e apresentam lesões não extensivas; resultantes de contato repetido, recente, com um adulto bacilífero e até os cinco anos de idade a transmissão é frequentemente de origem familiar. Convém enfatizar que um terço dos contactantes adultos com tuberculose ativa tem seu diagnóstico efetuado somente após a confirmação da doença na criança, ressaltando falhas na detecção da infecção e para identificação de contactantes e ainda inadequada quimioprofilaxia das formas latentes.^{1,17,18,19} Nelas predomina a forma pulmonar da TB, caracterizada por quadro clínico de irritabilidade, tosse por período superior a três semanas de duração, sudorese noturna e perda de peso.^{15,17} A febre habitualmente é moderada, persistente por mais de 15 dias e frequentemente vespertina, porém a hemoptise é rara.^{8,15} Já as formas extrapulmonares, com sinais e sintomas frequentemente inespecíficos e geralmente paucibacilares, tradicionalmente menos frequentes, vêm ganhando importância nesse grupo etário nos últimos 20 anos, em especial a linfadenite gânglionar periférica (submandibulares e cervicais).^{15,20} No entanto, a pleura e os ossos também são acometidos, com destaque em gravidade para a meningite tuberculosa e a miliar.^{1,15,17} Outras como a tuberculose digestiva peritoneal e intestinal, a pericardite, a geniturinária e a cutânea são raras.¹⁵

A imaturidade do sistema imune, principalmente até o quarto ano de vida, é fator determinante para o risco de desenvolvimento da doença após a infecção por *M. tuberculosis* em crianças imunocompetentes e ainda parece contribuir para a manifestação clínica peculiar da TB no período infantil.^{1,18} De fato, naquelas com idade inferior a cinco anos, pode ocorrer o desenvolvimento das formas graves como a miliar e a meníngea em menos de três meses após o início da doença.¹⁷

Nas três últimas décadas as infecções por micobactérias não tuberculosas (MNT), agentes de infecções pulmonares e extrapulmonares, apresentaram crescimento decorrente da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida, com reconhecimento clínico e laboratorial.^{16,20} A partir de 1990, os estudos genotípicos também contribuíram para o reconhecimento das MNTs ou para sua reclassificação, que contribuem para a prevenção e terapêutica adequada.^{16,20,21}

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) podem ser saprófitas, encontradas na água, solo, vegetação, e como parte da microbiota humana, mas também patogênicas ou oportunistas.^{11,16,20,21,22} Nessa direção algumas são agentes etiológicos de infecções de pele e tecidos moles, infecções pós

cirúrgicas, como procedimentos estéticos (mesoterapias e lipoescultura), abscessos após injetáveis, associação ao uso de cateteres, pela inoculação direta de ambientes aquáticos, por traumas e feridas cirúrgicas.^{16,22} Distinguem-se do complexo *Mycobacterium tuberculosis* pelas diferenças de habitat, contagiosidade e padrão de susceptibilidade aos antimicobacterianos.¹⁶ Devido à ampla distribuição ambiental e a participação como colonizante humano, a definição de infecção por MNT deve ser avaliada com cautela, por meio de critérios pré-estabelecidos pela American Thoracic Society.^{8,11,16,20} Além disso, a contaminação das culturas por essas bactérias também pode trazer dificuldade na interpretação de seu papel como patógeno humano.^{16,21} A linfadenite cervical é considerada a forma mais comum de infecção por MNTs em crianças de um a cinco anos, e os linfonodos mais atingidos são os submandibulares, convém salientar a importância do diagnóstico diferencial entre a infecção causada por MT e MNT ou complicações da Vacina BCG.¹¹ O *Mycobacterium avium* é o agente mais prevalente nas linfadenites em crianças, no entanto outras MNTs que causam essa infecção em criança são *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*.²³ Outro tecido também comumente afetado no período infantil é a pele.¹⁶

A infecção pelo HIV é uma condição relacionada ao alto risco de tuberculose, por *Mycobacterium tuberculosis* e micobacterioses por MNT.^{18,24,25} O comprometimento da imunidade no HIV/AIDS é o principal fator de risco para tuberculose ativa.^{13,14,25} Na cadeia de transmissão o evento comum é a criança soropositiva para o HIV/doente de AIDS ser contaminada pelo bacilo disseminado por adultos bacilíferos.¹³ Na co-infecção TB/HIV, o diagnóstico é difícil e há alta susceptibilidade para forma ativa da tuberculose com rápida progressão para óbito por supressão imune.²⁶ Nas crianças infectadas pelo HIV, a TB é considerada a maior causa de morbimortalidade.¹³

Enquanto as crianças imunocompetentes infectadas pelo bacilo, indicado por um Teste de Sensibilidade a Tuberculina (TST) positivo têm 10% de chance de desenvolver a forma ativa ao longo da vida, nos indivíduos infectados pelo HIV, sem intervenção terapêutica, essa probabilidade é de cerca de 10% ao ano.²⁷ Desta maneira prevenir a tuberculose-doença na criança HIV positiva já infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* é de fundamental importância, e tem como objetivo a rápida instituição da terapia anti-retroviral, o diagnóstico e o tratamento (quimioprofilaxia) da infecção tuberculosa latente em indivíduos infectados pelo HIV.^{1,27} O tratamento da infecção tuberculosa latente em crianças portadores do HIV sabidamente previne o desenvolvimento da tuberculose nesses indivíduos de forma significativa, assim o diagnóstico por meio do teste tuberculínico a partir dos dois anos de idade e o tratamento efetivo fazem parte das recomendações nacionais do Ministério da Saúde desde 2000.^{15,28}

A vacina de Calmette-Guérin (BCG), em uso desde 1921, baseia-se em uma variedade atenuada do *Mycobacterium bovis* e é, ainda, a medida mais eficaz para prevenção da doença grave da criança, mas incapaz de impedir o surgimento da TB pulmonar ao longo de seu desenvolvimento.^{29,30,31} No Brasil, a imunização

injetável foi adotada desde 1976 para todos os recém nascidos menores de um ano de idade e a OMS recomenda a imunização ao nascer para as crianças de países com alta prevalência de tuberculose. Uma ressalva refere-se às crianças infectadas pelo HIV, dado o risco da BCG doença.^{15,30} Convém salientar que a cicatriz decorrente da reação celular local pós-vacinação é utilizada como marcador de eficácia, muito embora aproximadamente 10% das crianças eficazmente imunizadas pela BCG não mostrem tal manifestação cutânea.³¹

Desafios diagnósticos

As crianças portadoras da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* são consideradas por diversos autores como “órfãos da tuberculose”.^{13,14} De fato, a dinâmica de interação do bacilo de Koch com o hospedeiro humano em tenra idade é bastante peculiar em suas manifestações o que impacta, diretamente, o seu diagnóstico.^{3,14} Além disso, as crianças pouco contribuem para disseminação da doença na comunidade, o que diminui a atenção dos programas de controle da TB quanto ao diagnóstico e profilaxia da TB infecção nessa população.^{3,18,32} Contudo, a infecção tuberculosa latente infantil requer abordagens precoces para evitar as formas graves bem como para prevenir a TB pulmonar. Infelizmente, a prática atual nos países em desenvolvimento é inversa, ou seja, somente após doença pulmonar não responsiva ao tratamento antibacteriano de eleição contra patógenos habituais, a etiologia tuberculosa é considerada.^{15,17,24,32}

O diagnóstico de TB na infância, segundo preconizado pela OMS, enfatiza a importância da compatibilidade entre achados clínicos, radiológicos, dados epidemiológicos (contato prévio com adulto que tenha resultado de baciloscopia positiva ou negativa, mas com cultura positiva), sintomas sugestivos, Teste de Sensibilidade a Tuberculina (TST) positivo, microscopia de escarro positiva quando possível exame para o HIV, idade inferior a cinco anos e a má nutrição severa, sendo todos considerados como fatores que acrescem o risco.^{1,9} No Brasil, desde 2002, tal associação é recomendada pelo Ministério da Saúde em forma de sistema de pontuação em crianças e adolescentes com baciloscopia negativa. A limitação dessa estratégia está ligada ao fato de que o Brasil possui alta incidência de co-infectados TB-HIV, isso por que é frequente a ausência de um quadro clínico específico, de imagens radiológicas compatíveis com a doença, além de baixa sensibilidade da baciloscopia e TST dependente de outros resultados.^{3,9,15,19}

Embora o quadro clínico seja essencial para o diagnóstico da tuberculose e micobacterioses, a detecção da micobactéria permanece como confirmação diagnóstica e oportunidade de investigação do perfil de sensibilidade, favorecendo o tratamento efetivo.¹⁵ Rotineiramente, o diagnóstico laboratorial da tuberculose e das micobacterioses é realizado por técnicas fenotípicas.^{11,15} A baciloscopia de escarro é um método direto, não-invasivo, rápido e econômico, que requer de 5000 a 10000 bacilos por mililitro de amostra clínica. Assim, tem sensibilidade limitada para a detecção das formas paucibacilares da TB, sendo indicada somente a partir dos cinco anos. Dessa maneira, vários estudos testam novas metodologias para aumentar a frequência

de detecção dessas formas com pequena quantidade de bacilos, que acometem principalmente pacientes imunocomprometidos e crianças, em especial nos sítios extrapulmonares.^{1,3,15,17,33} Em áreas endêmicas, a microscopia do escarro é utilizada frequentemente como único teste laboratorial para diagnóstico da TB na infância, apesar de ser positiva em menos de 10 a 15% dos casos.^{13,32}

A cultura, considerada “gold standard” para o diagnóstico da tuberculose e de suas formas extrapulmonares apresenta maior sensibilidade, com detecção de 10 micobactérias por mililitro de escarro. Contudo, tal vantagem é comprometida para amostras paucibacilares e, ainda, requer de 6 a 8 semanas para a visualização de colônias, o que prolonga o diagnóstico definitivo da doença. Ademais, somente realizam a cultura um número limitado de laboratórios autorizados.^{11,15,26,33,34,35,36,37} Nessa direção, por exemplo, a confirmação em crianças ocorre de 30% a 50% dos casos de TB.^{15,19,26,36,37} Convém salientar outros dois inconvenientes dessa metodologia, relacionados à diminuição da viabilidade micobacteriana: a amostra pode sofrer contaminação durante o pré tratamento e resultados falso negativos podem ocorrer em pacientes sob terapia medicamentosa.³⁵ Por outro lado, as técnicas de biologia molecular, diferentemente da baciloscopia e cultura, são teoricamente capazes de detectar uma única cópia de ácido desoxirribonucleico (DNA) de qualquer organismo.³³

Colabora para a dificuldade de confirmação laboratorial da TB infantil, a dificuldade de expectoração voluntária de escarro. Assim a amostra clínica de escolha é o lavado gástrico, com característica dificuldade de coleta devido à necessidade de internação da criança.^{15,17,19,29} Desta maneira a baixa sensibilidade das técnicas fenotípicas contribui para a manutenção da forma assintomática ou latente da infecção, com aproximadamente 10% de risco para o estabelecimento da forma ativa.⁴

Associado aos recursos laboratoriais, o teste cutâneo da tuberculina (TST) ou intradermoreação, ainda permanece como uma das ferramentas mais utilizadas para o diagnóstico das crianças recentemente expostas a adultos com diagnóstico da doença e para os casos de tuberculose latente.^{14,29,38} Apesar de sua grande utilização, esse teste apresenta limitações como a baixa especificidade e ainda pode acarretar em efeito ‘boosting’ e reações falso positivas decorrentes da vacina de Calmette-Guerrin (BCG) e por contato prévio com micobactérias não tuberculosas.^{4,29,38} As doenças imunossupressoras ou medicamentos imunodepressores, a infecção pelo HIV, a desnutrição, a vacinação recente com vírus vivos (sarampo, varicela), a insuficiência renal crônica, as grandes queimaduras, a administração inadequada, os erros de leitura além de outros relacionados à própria qualidade da tuberculina podem ser responsáveis pelos resultados falso negativos. Ainda, o TST fornece resultado positivo apenas após três meses de contato com o agente etiológico, período em que pode ocorrer conversão da forma latente para ativa, principalmente em crianças.^{21,29,38,39} Lacunas importantes são deixadas por tais recursos no que se refere à determinação de infecção por *Mycobacterium* spp. em crianças e em alguns pacientes/sítios com dados epidemiológicos cada vez mais relevantes.^{4,22} Nesse cenário,

assumem maior importância novas estratégias diagnósticas, entre elas as técnicas moleculares com a promessa de melhor sensibilidade, especificidade e pronta detecção.^{4,13,17,22,34,35}

Assim, é premente a necessidade de técnicas que detectem qualquer número de micobactérias presentes em diferentes amostras clínicas suspeitas e, se possível, que confirmem a espécie em curto período de tempo, independentemente da faixa etária.³⁴

Por essa razão, recentemente, ensaios laboratoriais baseados em outras estratégias diagnósticas vêm sendo testados, entre eles a dosagem do interferon-gama além de diferentes ferramentas moleculares.^{5,40} O diagnóstico imunológico, conhecido como QuantiFERON-TB-Gold e ELISPOT, dentre outros ensaios imunoenzimáticos, são fundamentados na produção do interferon-gama por linfócitos T, e permitem determinar a sensibilização prévia do paciente por micobactérias além de confirmar infecção recente. Como vantagem não sofre interferência da vacinação prévia pela BCG e nem por *M. bovis*, já que os antígenos ESAT-6 e CFP-10 são exclusivos de MT. Apesar das vantagens em relação ao TST, seu resultado positivo pode significar sensibilização prévia, mas não necessariamente doença ativa.⁵ Adicionalmente, os estudos em crianças são pequenos e limitados o que impede sua liberação como recurso diagnóstico.^{13,32,39}

Assim, outra proposta diagnóstica bastante explorada são os métodos moleculares baseados na PCR, tanto os métodos “in house” como comerciais. Neles, várias seqüências alvo e conjuntos de oligonucleotídeos, assim como diferentes amostras clínicas são testadas.^{19,40} A detecção direta de *M. tuberculosis* em amostras clínicas por técnicas moleculares, possui duas metodologias aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA): o Teste AmpliCor *M. tuberculosis* (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ) e Enhanced *M. tuberculosis* Direct Test (E-MTD; Gen-Probe, San Diego, CA). O INNO-LIPA *Mycobacteria* é outro kit disponível (Innogenetics, Ghent, Belgium), com análise baseada na hibridização reversa utilizando a região 16S-23S RNAr de micobactérias.⁴¹

As metodologias que utilizam a PCR-RFLP foram desenvolvidas para vários genes micobacterianos como o *hsp65*, o mais frequentemente investigado, a região intergênia 16S-23S DNAr (ITS) e o *rpoB*.^{42,43,44} Os procedimentos que associam duas PCR, conhecidos como Nested PCR (NPCR) conciliam maiores sensibilidade e especificidade e a seqüência de inserção IS6110, e provavelmente o alvo mais estudado.^{25,43,45} Porém, estudos já demonstram a presença da seqüência de inserção IS6110 em MNT e tem sido reportadas, cepas de MT com ausência ou presença de poucas cópias dessa região genômica.⁴⁶⁻⁴⁸ A NPCR fundamenta-se na utilização de dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores em reações subseqüentes, cujo produto de amplificação da primeira é utilizado como molde para segunda, com a vantagem de diluição dos componentes inibidores que podem estar presentes nas amostras biológicas.^{19,43} Embora a NPCR seja considerada altamente sensível, a desvantagem é decorrente da necessidade da abertura do tubo após a primeira amplificação para transferência

do produto para segunda reação, assim nesse processo aumenta-se o risco de contaminação de amostras negativas com amplicons de amostras positivas.⁴⁹ Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e diminuir o potencial de contaminação, a PCR realizada em um único tubo (PCR *In-tube*) não necessita de abertura do tubo até o estágio de análise dos amplicons, após a finalização da reação, assim apenas os oligonucleotídeos internos precisam ser seqüestrados, sendo esses oligonucleotídeos imobilizados na face interna da tampa do microtubo, com fácil dissolução na mistura de reação para participar da segunda etapa de amplificação por meio da inversão do tubo.⁴⁹

Ainda, as técnicas que utilizam a PCR Multiplex têm a vantagem de diferenciação das espécies facilitando a escolha da terapia adequada e ainda podem ser utilizadas para a rápida detecção de micobactérias resistentes.³⁴ Estudiosos utilizaram uma *Multiplex* PCR baseada na amplificação de fragmentos de 165, 365 e 541 pb a partir do gene *hsp65*, que codifica o antígeno 65 kDa, da região *dnaJ* de micobactéria e do elemento de inserção *IS6110* de *Mycobacterium tuberculosis*.³⁴ O gene *hsp65* codifica o antígeno de 65kDa que é uma proteína altamente imunorreativa do gênero *Mycobacterium* e o gene *dnaJ* codifica uma proteína de estresse que é altamente conservado entre *M. tuberculosis* e *M. avium*, mas não em outras MNTs.³⁴

Ademais a PCR é o método de escolha para o diagnóstico da tuberculose em casos em que a baciloscopia é negativa, formas assintomáticas, origem de caso não identificado, ou não contactante na moradia, mas em que há suspeita clínica para a patologia.^{13,17,34,47} Outras vantagens são a utilização como ferramenta auxiliar no diagnóstico das formas meníngeas e miliar de maior gravidade e mais freqüentes em crianças, além de ser positiva em pacientes sob terapêutica antimicobacteriana.^{34,50} Dessa maneira, os resultados da biologia molecular, associada ao diagnóstico clínico, incluindo cuidadosa anamnese, fenotípico quando possível, e outras ferramentas como TST e Raios-X de tórax colaboram para o início do tratamento específico, reduzindo a gravidade da doença e colaborando para detecção do adulto infectante, já que a transmissão para criança é evidência de recente e repetitivo contato com adulto tuberculoso.^{18,19,43}

Referências bibliográficas

1. World Health Organization. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children. Geneva: WHO; 2006. [acesso em 2009 Jul 25]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_HTM_TB_2006.371_eng.pdf
2. Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis. Data and Statistics, 2009 [acesso em 2009 Jun 20]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/statistics/default.htm>
3. Maciel ELN, Dietze R, Silva RECF, Hadad DJ, Struchiner CJ. Avaliação do sistema de pontuação para o diagnóstico da tuberculose na infância preconizado pelo Ministério da Saúde, Brasil. *Cad Saude Publica* 2008;24(2):402-8.
4. Van-Lume DSM, Souza JR, Melo WG, Melo VL, Cabral MML, Rego JC, et al. Preliminary results in the immunodiagnosis of tuberculosis in children based on T cell responses to ESAT-6 and PPD antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103(4):401-4.
5. Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J Bras Pneumol* 2007;33(3):323-4.
6. World Health Organization. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO; 2009 [acesso em 2009 Ago 14]. Disponível em: www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/tbu_9.pdf
7. Brasil. Agravos de Notificação - Sinan Net. Casos confirmados por Ano Diagnóstico segundo Ano. Brasília: 2008. [acesso em 2009 Mar 10]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>.
8. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(4):367-416.
9. Sant'Anna CC, Hijjar MA. Recent contribution of the World Health Organization to control childhood tuberculosis. *Rev Saude Publica* 2007;41(Suppl 1):117-20.
10. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Distribuição de casos de tuberculose segundo faixa etária e forma clínica. 2008 [acesso em 2009 Mar 15]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/TB/tb_num/tb_cn08.htm
11. São Paulo. Secretaria Estadual de Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento. São Paulo: Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo; 2005 [acesso em 2009 Ago 31]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/MNT_Final_9-12-05a.pdf
12. Vendramini SHF, Gazetta CE, Chiaravalotti NF, Cury MR, Meirelles EB, Kuyumjian FG, et al. Tuberculose em município de porte médio do Sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade, de 1985 a 2003. *J Bras Pneumol* 2005;31(3): 237-43.
13. Marais BJ, Pai M. New approaches and emerging technologies in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Paediatr Respir Rev* 2007;8(2):124-33.
14. Rigouts L. Clinical practice: diagnosis of childhood tuberculosis. *Eur J Pediatr* 2009;168(11):1285-90.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2002 [acesso em 2009 Set 22]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_tuberculose.pdf
16. Piersimoni C, Scarparo C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis* 2008;8(5):323-34.
17. Herranz M, Bernaola E. Características de la enfermedad tuberculosa en la infancia. Clinical characteristics of tuberculosis in childhood. *An Sist Sanit Navar* 2007;30(Suppl 2):117-29.

18. Duarte R, Tavares E, Miranda A, Carvalho A. Tuberculosis in a child – search for the infected adult nearby; case report, Portugal, 2007. *Euro Surveill* 2009;14(36):1-3.
19. Lima JF, Montenegro LM, Montenegro RA, Cabral MM, Lima AS, Abath FG, et al. Performance of nested PCR in the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of pediatric patients. *J Bras Pneumol* 2009;35(7):690-7.
20. Thomson RM, Yew WW. When and how to treat pulmonary non-tuberculous mycobacterial diseases. *Respirology* 2009;14(1):12-6.
21. Ueki SYM, Martins MC, Telles MAS, Virgilio MC, Giampaglia CMS, Chimara E, et al. *Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo*. *J Bras Patol Med* 2005;41(1):1-8.
22. Castro C, Puerto G, García L, Orjuela D, Polo C, Garzón M, et al. Identificación molecular de micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción, Colombia 1995-2005. *Biomedica* 2007;27(3):439-46.
23. Thergerstrom J, Friman V, Nylen O, Romanus V, Olsen B. Clinical features and incidence of *Mycobacterium avium* infections in children. *Scand J Infect Dis* 2008;40 (6-7):481-6.
24. Boule A, Eley B. Comentario: reducing HIV-associated tuberculosis in children. *Int J Epidemiol*. 2009;38(6):1621-3.
25. Lannoy LH, Escalante JJC, Evangelista MSN, Romero GAS. Tuberculosis incidence and risk factors among patients living with HIV/AIDS in public health service institutions in Brasilia, Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41(6):549-55.
26. Ramírez-Cardich ME, Kawai V, Oberhelman RA, Bautista CT, Castillo ME, Gilman RH. Clinical of tuberculosis co-infection in HIV-infected children hospitalized in Peru. *Int J of Infect Dis* 2006;10(4):278-81.
27. Jamal LF, Moherdau F. Tuberculosis and HIV infection in Brazil: magnitude of the problem and strategies for control. *Rev Saude Publica* 2007;41(Suppl 1):104-10.
28. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Crianças e Adolescentes Infectados pelo HIV: manual de bolso. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids Brasília: Ministério da Saúde, 2009. [citado 2009 mai 7]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments>
29. 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(4Pt1):1376-95.
30. Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto ML. Vacina BCG contra *tuberculose*: efeito protetor e políticas de vacinação. *Rev Saude Publica* 2007;41(Suppl1):59-6.
31. Pérez-Then E, Shor-Posner G, Crandall L, Wilkinso J. The relationship between nutritional and sociodemographic factors and the likelihood of children in the Dominican Republic having a BCG scar. *Rev Panam Salud Publica* 2007;21(6):365-72.
32. Marais BJ, Pai M. Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Arch Dis Child* 2007;92(5):446-52.
33. Rodrigues MA, Serafini AB, Pereira MS, Silva TD, Rabahi MF, Alves SL, et al. Standardization of in-house polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* at the reference Tropical Disease Hospital in the State of Goiás, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(4):415-9.
34. Bhattacharya B, Karak K, Ghosal AG, Roy A, Das S, Dandapat P, et al. Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Trop Med Int Health* 2003;8(2):150-7.
35. Cho CH, Han SH, Chin BS, Choi SH, Lee HS, Kim CO, et al. Diagnosis and species identification of mycobacterial infections by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of sterile body fluids. *Korean J Intern Med* 2009;24(2):135-8.
36. Norlijah O, Intan HI, Feizel AMF, Kasim MS, Noh LM. Near miss diagnosis of childhood tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37(5):953-7.
37. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis* 2003;3(10):624-32.
38. Cascante J, Pascal I, Erguía V, Hueto J. Diagnosis of tuberculosis infection. *An Sist Sanit Navar* 2007;30(Suppl 2):49-65.
39. Petrucci R, Abu Amer N, Gurgel RQ, Sherchand JB, Doria L, Lama C, et al. Interferon gamma, interferon-gamma-induced-protein 10, and tuberculin responses of children at high risk of tuberculosis infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27(12):1073-7.
40. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Rev Saúde Pública* 1999;33(3):281-6.
41. Chemlal KC, Portaels F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16(2):77-83.
42. Wong D, Yip PC, Cheung DT, Kam, KM. Simple and rational approach to the identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex species, and other commonly isolated mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3768-71.
43. Assis NCS, Lopes ML, Cardoso NC, Costa MM, Souza CO, Lima KVB. Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Bras Patol Med Lab* 2007;43(1):1-7.
44. Kurabachew M, Enger O, Sandaa R, Skuce R, Bjorvatn B. A multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group-, and species-specific detection of mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49(2):99-104.
45. McEvoy CR, Falmer AA, Gey van Pittius NC, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2007;87(5):393-404.
46. Nava Paz O, Hassanhi M, Prieto L. Evaluación de la baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. *Kasmera* 2005;33(2):119-31.

47. Sekar B, Selvaraj L, Alexi A, Ravi S, Arunagiri K, Rathinavel L. The utility of IS6110 sequence based polymerase chain reaction in comparison to conventional methods in the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Microbiol* 2008;26(4):352-5.
48. Thong-On A, Smittipat N, Juthayothin T, Yanai H, Yamada N, Yorsangsukkamol J, et al. Variable-number tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 in Thailand. *Tuberculosis (Edinb)* 2010;90(1):9-15.
49. Abath FG, Melo FL, Werkhauser RP, Montenegro L, Montenegro R, Schindler HC. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. *Biotechniques* 2002;33(6):1210-2,4.
50. Gómez-Pastrana D. Tuberculosis in children-is PCR the diagnostic solution? *Clin Microbiol Infect* 2002;8(9):541-4.

Correspondência:

Adriana Antônia da Cruz Furini
Rua Raul de Carvalho, 1658
15025-300 - São José do Rio Preto, SP
e-mail: cruzdri@ig.com.br; adriana@unirp.edu.br
