

ANÁLISE DE METODOLOGIAS CONVENCIONAIS E MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM PACIENTES ATENDIDOS NO LEPAC/UEM

Marcos Madeira de Lima (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Katiany Rizzieri Caleffi-Ferraciolli, Daniela Ferrari Micheletti, Rhayana Lemos, Vera Lucia Dias Siqueira, Rosilene Fressatti Cardoso, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: rblscodro@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Microbiologia – Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, cultura, PCR.

Resumo:

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A cultura para o diagnóstico da TB é considerada padrão-ouro, porém é bastante demorada e o diagnóstico por pesquisa de DNA bacteriano vem crescendo e é uma ferramenta extremamente útil. O objetivo dessa pesquisa foi comparar os resultados obtidos pelos métodos de cultura bacteriana e molecular, buscando comparar estas metodologias no diagnóstico de TB. O estudo foi realizado com dados de pacientes atendidos no LEPAC/UEM. As amostras foram incubadas utilizando método automatizado BD BACTEC™MGIT™960 e a análise de DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Este projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da UEM, conforme parecer 1.573.890. Do total, 65 amostras foram submetidas à PCR. Somente foram escolhidas as amostras também submetidas à cultura (n = 25), sendo que 13 foram positivas na PCR e cinco na cultura. Nas amostras extrapulmonares (n = 12), observou-se que seis positivaram pela metodologia de PCR e uma positivou na cultura. Concluiu-se que a PCR é capaz de contribuir para um diagnóstico precoce e, conseqüentemente, um início rápido do tratamento de TB.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*, cuja forma pulmonar é mais relevante para a saúde pública, não apenas por ser mais frequente, mas também por apresentar um elevado potencial de disseminação por via aérea (LOBUE, ENARSON, THOEN, 2010).

Em países de média e baixa renda, que concentram a maior parte dos casos de tuberculose, a baciloscopia do escarro é o principal método utilizado no diagnóstico de tuberculose pulmonar, visto que não requer uma infraestrutura de alta complexidade para ser realizada (TUBERCULOSIS COALITION FOR TECHNICAL ASSISTANCE, 2006). Entretanto, a sensibilidade da baciloscopia é comprometida em amostras com menos de 10.000 bactérias/mL, além de apresentar um histórico de detecção pobre em determinados casos de tuberculose (DESIKAN, 2013).

Dentre as metodologias rápidas para identificar patógenos em amostras clínicas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta a sensibilidade mais adequada. Entretanto, sua utilidade clínica é dependente de diversos fatores, como a ausência de inibidores nas amostras, contaminação e os métodos utilizados durante a realização da técnica (YAMAMOTO, 2002). Assim, o objetivo dessa pesquisa foi comparar os resultados obtidos por PCR e cultura (padrão ouro), buscando avaliar o potencial papel dessa metodologia molecular no diagnóstico de tuberculose.

Materiais e métodos

Foi realizado um estudo retrospectivo dos resultados dos exames de PCR para BAAR e das culturas para tuberculose de pacientes atendidos no LEPAC/UEM. Foram identificadas 25 amostras, as quais foram incubadas utilizando método automatizado BD BACTEC™MGIT™960 (BD, Franklin Lakes- NJ, EUA). A amplificação do DNA micobacteriano foi realizada utilizando iniciadores específicos para o complexo *M. tuberculosis* TB1 (5' CCG GCG AGC GTA GGC GTC GG 3') e TB2 (5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') para amplificar um fragmento de 123 pares de bases da sequência IS6110.

Os resultados dos exames laboratoriais foram tabelados e as frequências calculadas, utilizando a planilha Excel® 2010. A análise estatística foi realizada utilizando o software OpenEpi Versão 3.01. Somente *p*-valores menores ou iguais a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da UEM, conforme parecer 1.573.890.

Resultados e Discussão

Entre as 25 amostras clínicas processadas (Tabela), pulmonares e extrapulmonares, 13 (52%) foram positivas para o complexo *M. tuberculosis* pela metodologia de PCR, enquanto cinco (20%) positivaram na cultura ($p = 0,1857$) ($\kappa = 0,2187$). Assim, a PCR, quando comparada à cultura, apresentou uma sensibilidade e especificidade de 80% e 55%, respectivamente.

Analisando especificamente as amostras extrapulmonares ($n = 12$), observou-se que seis (50%) amostras positivaram para o complexo *M. tuberculosis* pela metodologia de PCR, enquanto somente uma (8,3%) positivou na cultura ($p = 0,5$) ($\kappa = 0,1667$). Nesta análise, a PCR, quando comparada à cultura,

apresentou uma sensibilidade e especificidade de 100% e 54,55%, respectivamente.

Ao compararmos os resultados de ambos os testes diagnósticos, verificamos um menor nível de concordância entre essas metodologias nas amostras extrapulmonares. Segundo a classificação de Landis e Koch (1977), o nível de concordância entre os resultados obtidos na análise de todas as amostras foi razoável (0,21 – 0,40), enquanto nas amostras extrapulmonares este mesmo nível foi mínimo (0 – 0,20).

Nesse sentido, diversos estudos, ao discutirem os desafios envolvidos com o diagnóstico de tuberculose extrapulmonar (como a própria natureza paucibacilar dessas amostras), demonstram a utilidade da PCR na análise desse tipo de amostra. Khosravi et al. (2017), por exemplo, ao analisar 100 amostras extrapulmonares, observaram uma maior taxa de detecção pela PCR, destacando a dificuldade diagnóstica por parte das metodologias convencionais.

Tabela. Comparação entre os resultados da pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e em cultura para BAAR em amostras clínicas pulmonares (AP) e extrapulmonares (AEP).

		Resultado da cultura (AEP)		Resultado da cultura (AP)		Total
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Resultado da PCR	Positivo	1	5	3	4	13
	Negativo	0	6	1	5	12
	Total	1	11	4	9	25

Conclusões

A utilização de testes moleculares pode resultar em diagnósticos mais rápidos e acurados, permitindo o início antecipado do tratamento. Tal fato contribui para que o paciente acometido deixe de transmitir a doença mais precocemente, além de impedir que a infecção evolua para quadros mais graves. Assim, a PCR mostra-se como uma excelente ferramenta no diagnóstico de tuberculose ao atuar de maneira sinérgica com a cultura, seja fornecendo um resultado mais rápido para um caso sob suspeita ou analisando amostras em que os métodos convencionais apresentam dificuldades (como ocorre com muitas amostras extrapulmonares).

Agradecimentos

CNPq, Fundação Araucária, LEPAC/UEM, Laboratório de Bacteriologia Médica/UEM.

Referências

DESIKAN, P. Sputum smear microscopy in tuberculosis: Is it still relevant? **Indian Journal of Medical Research**, v. 137, n. 3, p. 442-444, 2013.

KHOSRAVI, A. D. et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens of Patients Suspected of Having Extrapulmonary Tuberculosis by Application of Nested PCR on Five Different Genes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 1-7, 2017.

LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A.; THOEN, T. C. Tuberculosis in humans and its epidemiology, diagnosis and treatment in the United States. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 10, p. 1226-1232, 2010.

TUBERCULOSIS COALITION FOR TECHNICAL ASSISTANCE. **International Standards for Tuberculosis Care (ISTC)**. The Hague: Tuberculosis Coalition for Technical Assistance, 2006.

YAMAMOTO, Y. PCR in Diagnosis of Infection: Detection of Bacteria in Cerebrospinal Fluids. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 3, p. 508-514, 2002.