

Revista de Saúde Pública

Journal of Public Health

Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar*

Problems in the standardization of the polymerase chain reaction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis

Valdes R. Bollela, Daisy N. Sato e Benedito A. L. Fonseca

Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP - Brasil (VRB, BALF); Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP - Brasil (DNS)

BOLLELA Valdes R., Daisy N. Sato e Benedito A. L. Fonseca **Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar** Rev. Saúde Pública, 33 (3): 281-6, 1999 www.fsp.usp.br/~rsp

Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar*

Problems in the standardization of the polymerase chain reaction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis

Valdes R. Bollela, Daisy N. Sato e Benedito A. L. Fonseca

Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP - Brasil (VRB, BALF); Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP - Brasil (DNS)

Descritores

Tuberculose pulmonar, diagnóstico.
Reação em cadeia por polimerase.
Mycobacterium tuberculosis.

Resumo

Objetivo

Padronizar reação em cadeia da polimerase para diagnóstico de tuberculose pulmonar, comparando os resultados obtidos com as técnicas microbiológicas clássicas, e analisar seu uso numa região de alta prevalência da tuberculose.

Métodos

Foram descontaminadas, após a baciloscopia, 42 amostras de escarro de pacientes. Em seguida, procedeu-se ao cultivo em Lowenstein-Jensen e à reação em cadeia da polimerase com "primers" que amplificam um fragmento de 123 pares de base do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*.

Resultados

Das 42 amostras de escarro, 10 apresentaram cultura positiva para *M. tuberculosis*. Dez foram positivas à baciloscopia e 16 mostraram-se positivas na reação em cadeia da polimerase. A sensibilidade e especificidade do teste em relação à cultura foi de 90% e 81%, respectivamente.

Conclusões

A reação em cadeia da polimerase tem sensibilidade comparável à da cultura e pode ser realizada em apenas um dia, resultando em tratamento precoce e melhor controle da doença. A padronização e avaliação de técnicas de biologia molecular no diagnóstico da tuberculose no Brasil é imprescindível na discussão da implantação deste exame na rotina diagnóstica em centros de referência.

Keywords

Tuberculosis, pulmonary diagnostic.
Polymerase chain reaction.
Mycobacterium tuberculosis.

Abstract

Introduction

The recent increase in the number of tuberculosis cases has called the world's attention once again to a perennial health problem, especially prevalent in developing countries. The time elapsed between the diagnosis and the institution of

Correspondência para/Correspondence to:
Benedito A. L. da Fonseca
Av. Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre
14049-900 Ribeirão Preto, SP - Brasil
E-mail: baldfons@fmrp.usp.br

* Apresentado nos Anais do VIII Congresso Panamericano e X Congresso Brasileiro de Infectologia, Salvador, Bahia, 1997.
Edição subvencionada pela FAPESP (Processo nº 98/13915-5).
Recebido em 2.6.1998. Reapresentado em 13.10.1998. Aprovado em 1.12.1998.

therapy is an obstacle to tuberculosis control and there is an urgent need for the development of techniques for the disease's rapid diagnosis. To achieve this goal, molecular biology techniques have been exhaustively investigated. This work describes the use of a polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis in a developing country. The sensitivity and specificity of this technique is compared to standard techniques used in the microbiology laboratory.

Methods

This study was undertaken in Ribeirão Preto, S. Paulo State, Brazil. Forty-two sputum samples from suspected cases of tuberculosis attending the municipal health care centers were sent to the microbiology laboratory. The samples were processed for the detection of Mycobacterium tuberculosis by acid-fast bacilli determination, culture in Lowenstein-Jensen medium, and by a polymerase chain reaction that amplified a fragment of 123 base pairs of the Mycobacterium tuberculosis genome.

Results

Of the forty-two samples studied, one was contaminated and excluded from the study, ten were culture positive, ten were positive for the presence of acid-fast bacilli, and sixteen were polymerase chain reaction positive. The sensitivity and specificity of this technique were 90% and 81%, respectively.

Conclusions

The polymerase chain reaction presented a sensitivity comparable to the culture and the whole procedure took only one day to complete. The results presented here make it a strong candidate for rapid diagnosis of tuberculosis in clinical settings making it possible to begin the specific therapy early in the course of the disease. However, standardization of the technique is necessary, and the correlation with clinical findings is of paramount importance due to the high sensitivity of this technique.

INTRODUÇÃO

Estima-se que um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que é a causa de aproximadamente 8 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes por ano¹⁴. Em várias regiões do mundo a tuberculose ainda é a principal causa de morte por um agente infeccioso isoladamente. Cerca de 26% de todas as mortes evitáveis no mundo são diretamente relacionadas à tuberculose¹⁴, que nunca deixou de ser um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. No entanto, a partir da década de 80, com a disseminação da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a deterioração dos programas de controle da doença, a tuberculose retorna como importante questão de saúde pública nos países desenvolvidos da América do Norte e Europa. Dados da Fundação Nacional de Saúde⁶, de 1996, mostram que o Brasil convive com 90 mil novos casos de tuberculose anualmente, morrendo cerca de cinco mil pessoas neste período. A região Sudeste é a mais atingida, com mais de 50% dos casos⁶. O indivíduo co-infectado (*M. tuberculosis* e HIV) tem risco 6 a 100 vezes maior de adoecer de tuberculose do que o indivíduo infectado apenas com o *M. tuberculosis*¹¹.

Dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo¹³, de 1994, mostravam que cerca de 14,7% dos casos novos de tuberculose apresentavam sorologia positiva para o HIV. Desde abril de 1993, a Organização Mundial da Saúde considera a tuberculose uma emergência global incentivando medidas de controle da doença em todo o mundo. Sem mudança nas condições socioeconômicas da população o controle da tuberculose reside no diagnóstico precoce e tratamento efetivo, além da vacinação e quimioprofilaxia para os contactantes.

Embora o diagnóstico presuntivo da tuberculose possa ser feito através de dados da história clínica e achados radiológicos, o diagnóstico definitivo ainda depende da baciloscopia e cultura. A microscopia direta após coloração pelo Ziehl-Neelsen, em busca de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), é um método rápido e barato. No entanto, tem baixa sensibilidade e especificidade. São necessários, no mínimo, 5.000 bacilos para que o teste seja positivo. Apesar de ser o padrão para a confirmação diagnóstica da tuberculose, a cultura requer de 4 a 8 semanas para um diagnóstico definitivo, pela própria característica de replicação lenta do *M. tuberculosis*⁹.

A mais promissora técnica para o diagnóstico rápido da tuberculose é baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica capaz de detectar até uma cópia de DNA de qualquer célula^{1,2}. Além de alta sensibilidade e especificidade, esta técnica é capaz de produzir resultados em algumas horas. A amplificação específica de seqüências de ácidos nucleicos através da PCR tem sido empregada no diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas⁸. Vários protocolos com diferentes “primers”, número de ciclos e tratamento de amostras vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico rápido da tuberculose^{4,6}.

Conhecendo a complexidade das técnicas de biologia molecular, buscou-se padronizar uma reação que pudesse ser realizada de maneira simplificada e fosse facilmente reproduzida em laboratórios com recursos mínimos para a realização do teste.

MÉTODOS

Cepa de Referência e Espécimes Clínicos

A cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis* HRA37 foi usada para a padronização dos parâmetros da reação e avaliação da sensibilidade da PCR, em relação à quantidade de cópias de genoma do *M. tuberculosis* que seriam detectadas por essa técnica.

Amostras de escarro de 42 pacientes, enviadas ao laboratório, entre janeiro e março de 1996, foram avaliadas pela técnica da auramina-rodamina e Ziehl-Neelsen em busca de BAAR, e em seguida tratadas para cultivo em Lowenstein-Jensen e PCR.

Processamento das Amostras de Escarro

Todas as amostras foram descontaminadas pelo método de Petroff, com NaOH 4%⁹. Após ser semeado em meio sólido, o material restante foi estocado a -20°C em “eppendorfs” de 1,5 ml.

Extração do DNA

Técnica adaptada de Kocagöz et al.⁸ consistiu da lavagem repetida do sedimento do escarro com Tris-HCl EDTA (TE), 10mM Tris pH = 8,0 e 1mM EDTA, por 3 vezes, e centrifugadas a 13.500 rpm. Após cada centrifugação, o sedimento era suspenso em 500 µl de tampão TE e agitado vigorosamente por 30 s. Na última vez, o “pellet” foi suspenso em 50 µl de TE, fervido 10 min e centrifugado a 13.500 rpm por 5 min. Cinco microlitros do sobrenadante foi usado para a PCR.

“Primers”

Os “primers” usados no presente trabalho foram originalmente descritos por Eisenach et al.⁴ e amplificam uma seqüência de inserção repetitiva do genoma de mico-

bactérias do Complexo *M. tuberculosis* (IS6110). O produto da amplificação são fragmentos de 123 pares de base. A seqüência dos “primers” é vista na Tabela 1.

Tabela 1 - Seqüência dos “primers” usados na reação em cadeia da polimerase para tuberculose, descritos por Eisenach et al.⁴

TB1	5' - C C T G C G A G C G T A G G C G T C G G - 3'
TB2	5' - C T C G T C C A G C G C C G C T T C G G - 3'

Protocolo de Amplificação do DNA

Utilizaram-se reagentes do “kit” *GeneAmp*[®]. Para volume final da reação de 50µl, 5µl do DNA extraído foi acrescentado a 45µl da mistura de reagentes da PCR contendo 1,25 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, tampão da Taq DNA polimerase (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 0,15 mM MgCl₂; 0,01% gelatina), 20 pmol de cada “primer”.

A amplificação consistiu de uma fase inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos com 1 min a 94°C para desnaturação, 2 min a 65°C para ligação dos “primers” ao molde genômico e 1 min a 72°C na extensão do amplificado, em cada ciclo. Ao final manteve-se a temperatura em 72°C por 10 min para a polimerização dos fragmentos incompletos. O amplificado de 123 pares de base foi separado por eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio 1µg/ml, analisado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado em máquina Polaroid DS34.

Controles da PCR

A cada amplificação das espécimes clínicas, os controles positivos com DNA, extraído da cepa de referência, e os negativos com todos os reagentes da PCR acrescidos de 5µl de TE, usado para lavar as amostras de escarro, eram feitos simultaneamente.

Análise de Sensibilidade e Especificidade

Foi feita nos moldes clássicos da epidemiologia, avaliando-se os resultados em tabela 2X2 para obter sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo da PCR comparada à cultura do *M. tuberculosis* em meio sólido de Lowenstein-Jensen.

RESULTADOS

A padronização da PCR requer processamento criterioso das amostras para evitar intercorrências que podem interferir nos resultados do teste. Após a amplificação, observou-se a presença da banda de 123 pares de base na definição dos positivos nas amostras (Figura).

Das 42 amostras de escarro enviadas ao laboratório, 10 apresentaram resultados positivos à baciloscopia, sendo duas dessas com cultura negativa.

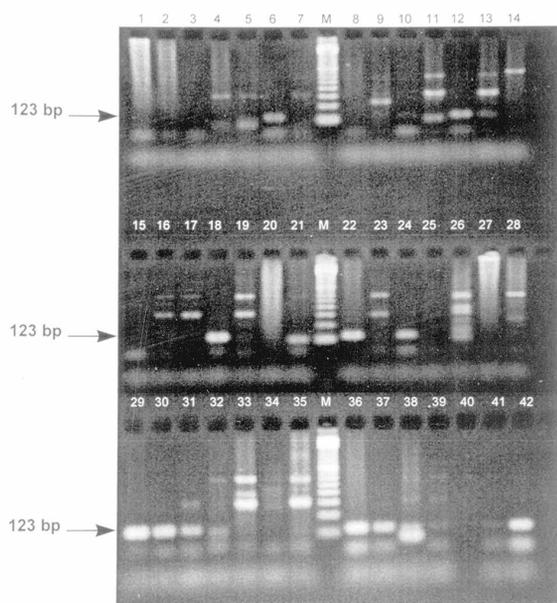


Figura - Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos amplificados na reação em cadeia da polimerase para tuberculose. Amostras positivas: 6; 12; 13; 18; 22; 24; 29-32; 36-39; 41 e 42.

Dez amostras foram positivas com crescimento de *M. tuberculosis*, no cultivo em meio sólido de Lowenstein-Jensen, e 16 mostraram-se positivas na PCR (Figura). Em uma amostra positiva na PCR a cultura contaminou e foi excluída da análise. A sensibilidade e especificidade do teste em relação à cultura, considerada o padrão-ouro para a confirmação diagnóstica, foi de 90% e 81%, respectivamente. Os valores preditivo positivo e negativo foram 60% e 96%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da reação em cadeia por polimerase (PCR) e da cultura para *M. tuberculosis*.

Cultura	PCR		Total
	+	-	
+	9	1	10
-	6	25	31
Total	15	26	41

Sensibilidade = 90%

Especificidade = 81%

Valor preditivo positivo = 60%

Valor preditivo negativo = 96%

DISCUSSÃO

A grande dificuldade no diagnóstico da tuberculose reside no tempo necessário para a confirmação diagnóstica. Atualmente, com o aumento no número de co-infecção tuberculose e HIV, além de apresen-

tações atípicas, depara-se com pacientes muito graves que precisam de instituição de terapêutica rápida e precisa. A associação do HIV e outras micobacterioses tem se tornado freqüente, devendo ser considerada no diagnóstico diferencial da tuberculose. A baciloscopia além de pouco sensível, é incapaz de diferenciar estas duas situações comuns para o clínico e infectologista. A cultura apesar da alta especificidade, demanda tempo para o resultado, tempo que geralmente não é disponível frente a casos graves, como os de imunodeficientes. A letalidade da tuberculose em indivíduos infectados pelo HIV pode ser 2,4 a 19 vezes maior que nos indivíduos não infectados⁷. Por utilizar “primers” que são específicos para micobactérias do complexo *tuberculosis*, a PCR é capaz de, em poucas horas, definir sobre a presença ou não do patógeno na amostra e indicar a melhor terapêutica para o caso. Em condições extremas, esta técnica pode ser refinada para torná-la capaz de determinar não só a presença, mas também a sensibilidade de micobactérias aos tuberculostáticos disponíveis para o tratamento da tuberculose, além de estudos de epidemiologia molecular e tipagem de cepas em cultura¹².

Quando se analisa um novo método, o desempenho do teste-padrão é um parâmetro crítico. Para a detecção do *M. tuberculosis* a cultura pode ser considerada o “gold standard”, por ter especificidade de 100% e sensibilidade de aproximadamente 90%². Para que a cultura de um espécime clínico seja positiva são necessárias entre 10 e 100 células de *M. tuberculosis* na amostra². A PCR é capaz de detectar até uma cópia de DNA de *M. tuberculosis*, como já foi demonstrado por Eisenach et al⁴. O presente resultado mostrou um teste capaz de detectar até 3 bacilos em uma solução-padrão (dados não mostrados), o que confirma a extrema sensibilidade da técnica em amplificar seqüências genômicas do *M. tuberculosis*. Em amostras clínicas como o escarro, em que estão presentes várias substâncias inibidoras da PCR, o resultado também foi satisfatório, com sensibilidade de 90%. A padronização da técnica, principalmente da extração do DNA, é fundamental no sucesso do teste. Observou-se que a lavagem exaustiva do escarro descontaminado é essencial, pois elimina substâncias inibidoras da *Taq* DNA polimerase que poderiam gerar resultados falso-negativos, comprometendo a sensibilidade do teste⁵. Apesar deste cuidado, uma entre as 10 amostras com cultura positiva foi PCR negativa.

A PCR mostrou uma sensibilidade de 90% e especificidade de 81% quando comparada somente com os resultados da cultura. Dos 31 pacientes com cultura negativa, 6 apresentaram PCR positiva, o que representa uma perda de 19% na especificidade, e das 15 PCR positivas, 6 eram cultura negativa, expressa no valor preditivo positivo de 60%. Dentre os 6 pacientes com cultura negativa e PCR positiva, 2 tinham baciloscopia positiva, sendo importante esclarecer que a PCR não foi avaliada considerando essa informação, ou dados clínicos dos pacientes. Somente a cultura positiva foi critério para a definição de caso de tuberculose, o que pode ter excluído indivíduos doentes em que a cultura teve resultado negativo. Portanto, é realmente possível que entre esses 6 exames houvesse pacientes com tuberculose que não foram considerados nesta análise, pela definição restrita de caso e por não se dispor das informações clínicas. A correlação dos resultados com a apresentação clínica do paciente é crucial na avaliação do teste, pois pode-se diagnosticar tuberculose por indícios clínicos e laboratoriais quando a cultura está negativa e confirmar a hipótese após prova terapêutica. O maior número de PCR positivas do que culturas com crescimento de *M. tuberculosis* pode ser decorrente também da limitação intrínseca do cultivo, que tem uma sensibilidade em teoria menor que a da PCR. Outra limitação observada, quando se avaliou o teste apenas considerando o resultado microbiológico convencional, é a possibilidade de contaminação da cultura com bactérias ou fungos, como aconteceu em uma amostra do presente estudo, levando ao descarte da mesma. O tratamento da amostra para descontaminação, com hidróxido de sódio, pode inativar o *M. tuberculosis* e resultar em cultura falso-negativa. Por outro lado, a PCR pode detectar a presença do DNA e não a viabilidade do bacilo, podendo amplificar material genético de microorganismos mortos ou "latentes", gerando resultado de PCR falso-positivo. Uma extensão da presente pesquisa está sendo desenvolvida com maior número de amostras, analisando a PCR contra resultados microbiológicos e informações clínicas, para avaliar a amplitude das limitações citadas acima e a real importância da PCR no diagnóstico da tuberculose pulmonar no Brasil.

Por ter grande potencial como ferramenta de alta sensibilidade e especificidade, além da rapidez no diagnóstico laboratorial da tuberculose, vários grupos têm desenvolvido esta tecnologia, inclusive com desenvolvimento de "kits" comerciais, o que torna o teste muito caro³. Apesar disso, PCR "in house" é factível considerando o custo de uma internação de um paciente com tuberculose, aguardando o diagnóstico definitivo, ou sua presença no ambiente familiar e social com alto risco de transmissão que essa doença possui. O grande impacto na prevenção da disseminação da tuberculose deve-se a instituição do tratamento específico, o mais precocemente possível. Para não se iniciar, empiricamente, tratamento que tem conhecidos efeitos colaterais e longa duração, o diagnóstico precoce é de fundamental importância, tanto do aspecto individual como de saúde pública. O desenvolvimento e padronização própria para o teste torna seu custo mais acessível, tendo em vista que esta tecnologia deve ser reservada para centro de referência em diagnóstico e tratamento da tuberculose.

O presente trabalho é um dos primeiros de investigação do uso da PCR no Brasil, que apesar das condições de saúde pública menos favoráveis quando comparado aos países desenvolvidos, deve avaliar o uso rotineiro da PCR. Certamente a PCR terá muita importância no diagnóstico da tuberculose no Brasil, quando usada com critério e em centros de referência para o tratamento da tuberculose. Não se acredita que a PCR possa substituir ou superar plenamente as ferramentas diagnósticas atualmente disponíveis para a confirmação da tuberculose. O exame clínico cuidadoso, o estudo radiográfico, a baciloscopia e a cultura às vezes são insuficientes para a definição-diagnóstica. A disponibilidade de uma ferramenta potente como a PCR será de grande utilidade para essa definição com maior precisão e precoce instituição terapêutica.

No entanto, como ressaltam Kritski et al.¹⁰, antes que tais exames se incorporem à rotina diagnóstica, deve-se realizar estudos controlados para padronizar e avaliar as técnicas de biologia molecular no Brasil, com pacientes locais, considerando que a prevalência de tuberculose sempre foi muito elevada e agora também a co-infecção AIDS-TB tem sido diagnosticada com alta frequência no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Barnes PF, Barrows SA. Tuberculosis in the 1990s. *Ann Intern Med* 1993; 119:400-10.
2. Bates JH. Diagnosis of tuberculosis. *Chest* 1979; 76:757-63.
3. Cartuyvels R et al. Prospective clinical evaluation of amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test as a screening method in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2001-3.
4. Eisenach KD et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161:977-81.
5. Fonseca BAL, Bollela VR. Tratamento das amostras de escarro para extração de DNA é essencial para o sucesso da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da tuberculose. *Braz J Infect Dis* 1997; 1 S1:57.
6. Forbes BA. Critical assessment of gene amplification approaches on the diagnosis of tuberculosis. *Immunol Invest* 1997; 26:105-16.
7. García MLG et al. Epidemiología del SIDA y la tuberculosis. *Bol Oficina Sanit Panam* 1994; 116:546-65.
8. Kocagöz T et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1435-8.
9. Koneman EW et al. Diagnostic microbiology. In: Koneman EW, Allen SD. *Mycobacteria*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1992. p. 703-55.
10. Kritski AL et al. Reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. *J Pneumol* 1997; 23:33-42.
11. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis. *Bol Epidemiol AIDS*, 1996.
12. Otal I et al. Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol* 1997; 35:273-7.
13. Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica/Divisão de Tuberculose. *Tuberculose: uma emergência mundial*. São Paulo; 1995.
14. Snider JDE, Montagne JRL. The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 World Congress on Tuberculosis. *J Infect Dis* 1994; 169:1189-96.