



AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA A DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS APLICADO AO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR.

Graziele Lima Bello; Biomedicina/ULBRA

Linck, N.; PPGBiosaúde/ULBRA

Rossetti, M. L.; Biomedicina e PPGBiosaúde/ULBRA

A tuberculose, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, é considerada uma das mais preocupantes doenças de notificação compulsória no Brasil. No Estado do Rio Grande do Sul a taxa de coinfeção TB/HIV é o dobro do resto do país e casos de multirresistência às principais drogas do tratamento já são comuns. O diagnóstico de rotina é o microbiológico, sendo constituído de baciloscopia e/ou cultura. Entretanto, a maioria dos locais utiliza apenas a baciloscopia que tem em torno de 50% de sensibilidade, fazendo com que exames complementares e a sintomatologia sejam necessários para o fechamento de cada caso. O objetivo deste estudo foi avaliar uma metodologia molecular na identificação de DNA de *M. tuberculosis* diretamente de amostras clínicas de escarro coletadas de pacientes atendidos no setor de fisiologia do município de Canoas (RS), sendo os resultados comparados com a cultura e baciloscopia. O DNA foi amplificado por PCR, após a extração com sílica. A detecção de DNA amplificado foi realizada por reação colorimétrica em placas de ELISA sensibilizadas com sondas específicas do elemento de inserção IS6110 do genoma. Foram analisadas 204 amostras de escarro quanto à presença/ausência de DNA genômico de *M. tuberculosis* frente à aplicação do método descrito. Das 36 amostras positivas em cultura de *M. tuberculosis*, 28 foram positivas no teste. Das 168 amostras negativas em cultura, 152 negativaram ao uso do *kit* molecular. Os valores de falso positivos e falso negativos foram, respectivamente, 16 e 8 amostras. O valor de sensibilidade encontrado foi de 77%, enquanto a especificidade correspondeu a 90,5%. O valor preditivo positivo (VPP) foi 63% e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 95%. Em se tratando da probabilidade pré-teste (prevalência), o valor encontrado foi de 17,6%. O índice kappa, que diz respeito à concordância de resultados de métodos diagnósticos, foi de 0,63 (bom resultado e considerado substancial segundo a classificação epidemiológica). Portanto, diante da avaliação realizada, foi possível concluir que o método de identificação de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* por hibridização reversa mostrou-se aplicável e reprodutível à rotina de um laboratório de análises, bem como, ao desenvolvimento de novas tecnologias aplicáveis à saúde pública.

Palavras-chave: Tuberculose; Detecção por PCR; Saúde pública.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) continua sendo um grande problema global de saúde pública, responsável por milhares de mortes entre milhões de pessoas a cada ano. A TB, dentre as doenças infecciosas em todo o mundo, é a segunda causa de morte entre os portadores do vírus do HIV (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2013). No Brasil, foram 70 mil casos novos de TB notificados em 2012; 4,6 mil mortes no ano de 2010 e foi considerada a quarta causa de mortes por doenças infecciosas (CEVS, 2012).

Canoas, assim como outros municípios da área metropolitana são considerados municípios prioritários nas ações de combate à doença, pois concentram cerca de 60% dos casos de tuberculose ao ano no RS.

A espécie *M. tuberculosis* é responsável pela tuberculose humana. As espécies de MNT podem ser isoladas da água, solo, de vegetais e animais e algumas espécies podem ser encontradas como microbiota da epiderme e do trato respiratório e digestório.

OBJETIVOS

- (1) Analisar amostras de escarro de pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar pelos respectivos métodos: Detect-TB (molecular), BAAR (microbiológico) e cultura (microbiológico) – considerada padrão ouro de diagnóstico.
- (2) Avaliar sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e probabilidade pré-teste (prevalência) do método molecular utilizado frente aos testes tradicionais.
- (3) Aplicar o índice Kappa estatístico, que se refere a uma medida de associação usada para descrever e testar o grau de concordância (confiabilidade e precisão) entre o teste de detecção molecular e o teste padrão-ouro (cultura).

METODOLOGIA

No presente estudo transversal foram utilizadas 204 amostras clínicas de escarro e avaliadas quanto à presença de *Mycobacterium tuberculosis*. As amostras de escarro foram provenientes do Departamento de Tisiologia da Secretaria de Saúde do município de Canoas, no ano 2012. Os resultados das análises de aplicação do *Kit* de identificação molecular (Detect-TB) foram comparados com os resultados de cultura para o complexo *Mycobacterium* em meio sólido de crescimento Ogawa-Kudoh (mesmo utilizado pelo Laboratório Central do Estado – LACEN), realizada no laboratório SIESP da ULBRA; e, comparados ainda, com os resultados de Baciloscopia obtidos do livro de registros do SILTB, que se encontra no laboratório de análises clínicas do Hospital de Pronto Socorro deste município. O sistema de detecção molecular deu-se de acordo com o esquema abaixo:

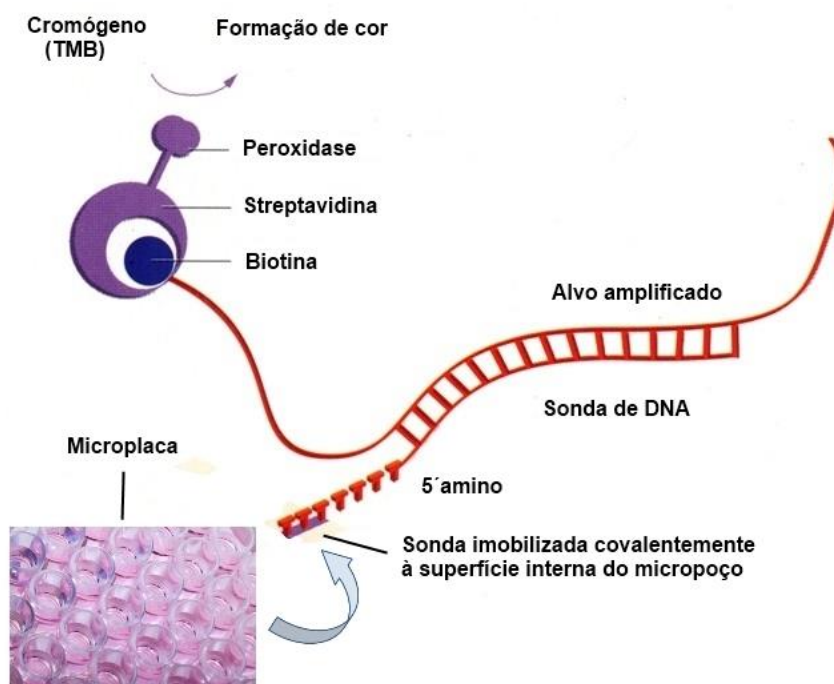


Figura 1: Detecção em microplaca de ELISA: Foi realizada a extração de DNA de amostra clínica de escarro e amplificado o alvo genômico (IS6110) do *M. tuberculosis* através da técnica de PCR. A microplaca foi sensibilizada com uma sonda imobilizada covalentemente à superfície interna do poço (sonda compatível com o alvo), ligada a uma extremidade contendo uma molécula de

amina pela qual a referida sonda possui afinidade química. Após a desnaturação do alvo amplificado, que possuía uma molécula sinalizadora (biotina) ligada a sua extremidade, este hibridiza-se com a sonda. Com a adição de uma solução contendo a enzima estreptavidina peroxidase, esta se liga à biotina (molécula sinalizadora). Adicionando o substrato (cromógeno) ocorre a reação enzimática e a liberação de cor, que posteriormente foi medida a absorvância por espectrofotômetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 204 amostras de escarro quanto à presença/ausência de DNA genômico de *M. tuberculosis* frente à aplicação do método descrito. Os resultados seguem conforme figura a seguir:

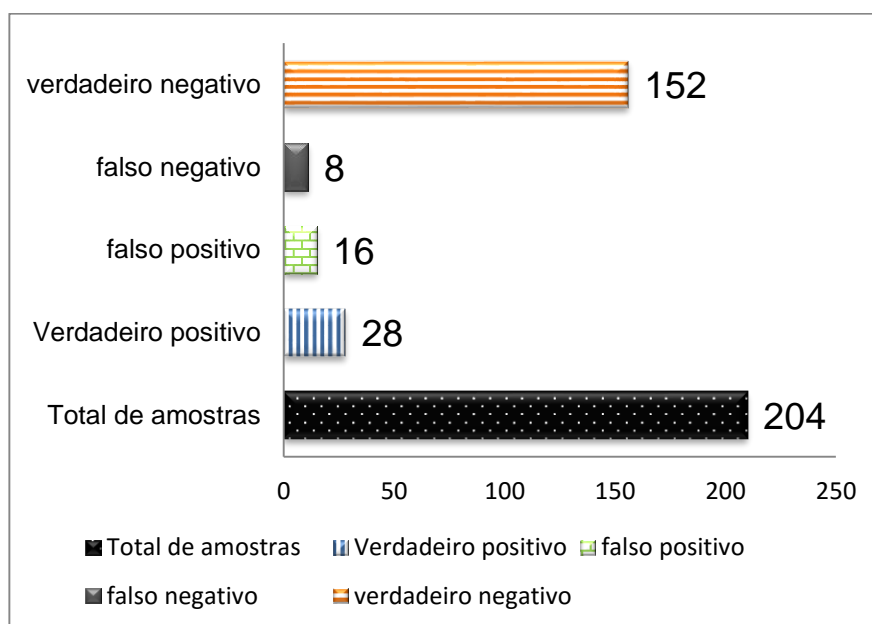


Figura 2: comparação dos resultados gerais de análise.

Em relação aos valores de sensibilidade e especificidade temos, respectivamente, 77 e 90,5%.

No que diz respeito ao valor preditivo positivo (VPP), que é a probabilidade do indivíduo estar doente dado que o seu teste teve resultado positivo, o valor

calculado foi de 63%. Já o valor preditivo negativo (VPN), que trata da probabilidade do indivíduo não estar doente dado que o seu teste teve resultado negativo, o valor obtido foi de 95%.

É possível avaliar ainda, a probabilidade pré-teste (prevalência), que diz respeito à linha de base que é realizada por um estudo transversal. O resultado obtido foi de 17,6%. Cabe ressaltar aqui, que se a prevalência (cálculo baseado nos resultados positivos no teste padrão = cultura) fosse maior, o percentual do valor preditivo positivo do teste molecular aplicado também o seria.

Em se tratando de análise de integridade (análoga à precisão), foi aplicado o índice de Kappa; amplamente utilizado, que corrige a concordância ao acaso (varia de +1 à -1). Ou seja, para descrevermos a intensidade da concordância entre dois métodos de classificação (por ex. dois testes de diagnóstico), utilizamos a medida Kappa que é baseada no número de respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os juízes. O Kappa é uma medida de concordância Inter observador e mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso.

A classificação para o uso de kappa em epidemiologia é dado da seguinte forma:

KAPPA > 0,80 é considerado excelente.

KAPPA 0,60 – 0,80 é considerado bom.

KAPPA 0,40 – 0,60 é considerado regular.

KAPPA < 0,40 é considerado ruim.

O índice de Kappa encontrado foi de 0,63; sendo considerado, portanto, um bom resultado no que diz respeito à concordância entre o teste molecular e o teste referência (cultura).

Segundo estudo de Huf e Kritski (2012), a OMS tem proposto testes que aumentem a sensibilidade da baciloscopia. Entretanto, na prática, até 2007, com o uso universal apenas da baciloscopia de escarro, 30-40% dos pacientes atendidos nos serviços de saúde em países em desenvolvimento eram tratados para tuberculose sem a confirmação bacteriológica.

Em suma, o ensaio colorimétrico por hibridização reversa em microplacas utilizado no presente estudo, oferece várias vantagens sobre as técnicas alternativas. Além do custo reduzido em comparação com os atuais *kits* comerciais, os resultados deste ensaio são baseados em espectrofotometria e, portanto, não dependem da interpretação humana. Além disso, este ensaio é semelhante em certos aspectos ao ELISA, facilitando a sua aplicação em laboratórios de rotina em regiões com alta prevalência e/ou incidência de TB e TB/HIV.

CONCLUSÃO

Este método molecular de detecção para diagnóstico da TB pulmonar mostra uma aplicação promissora para laboratórios de análises. E, investir neste tipo de desenvolvimento significa investir, buscar novos meios de solucionar um problema que acomete nossa sociedade há milhares de anos, tornando mais efetiva a aplicação da saúde pública, principalmente em países como o Brasil, que carecem de assistência básica à população.

REFERÊNCIAS

BARRETO, Leonardo Bruno Paz Ferreira Barreto et al. Utilização do amplified Mycobacterium tuberculosis directtest em amostras respiratórias de pacientes HIV positivos no Brasil. **J Bras Pneumol**. 2014;40(2):148-154, 2014.

BOLLELA, Valdes R.; SATO, Daisy; FONSECA, Benedito A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Revista de saúde pública**. Vol. 33/nº3, junho 1999, p.281-6

BRASIL, **Boletim Epidemiológico Tuberculose 2014**. Disponível em: <http://www.vigilanciaemsaude.ba.gov.br/sites/default/files/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>, acesso em 24.02.15.

BRASIL, disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/lista/210/Tuberculose>, acesso em 08.03.15.

Center for DiseaseControl (CDC). Disponível em: tb_factsheetCDC.pdf, acesso em 08.03.2015.

DORMAN, S; HOPKINS, Johns. Advances in the diagnosis of tuberculosis: current status and future prospects. **INT J TUBERC LUNG DIS** 19(5):504–516 Q, 2015.

FERREIRA JUNIOR, S. L. M.; COSTA, E. R. D.; SANTOS, P. G.; GOMES, H. M. ; SILVA, M. S. N.; ESTEVES, L. S.; OLIVEIRA, M. M.; MASCHMANN, R. A.; KRITSKI, A. L.; SUFFYS, P. N.; ROSSETTI, M. L. R. **In house reverse membrane hybridisation assay versus GenoTypeMTBDRplus and their performance to detect mutations in the genes rpoB, katG and inhA. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** (Impresso), v. 109, p. 307-314, 2014.

HUF, Gisele; KRITSKI, Afrânio. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. **J. Bras. Pneumol.** 2012, 38 (2): 237-245.

MENEZES, Alexandre; TRAJMAN, Anete. Global Health Strategies, Rio de Janeiro- **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 23(3):537-540, jul-set 2014.

WHO, disponível em http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/mozambique_tb.pdf, acesso em 08.03.15.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane M. P. – **Biologia molecular básica**. 4ª ed. – Artmed, Porto Alegre, 2012.

