

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**JUSSARA PATRICIA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DE NOVOS MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE  
PULMONAR EM COMPARAÇÃO COM MÉTODOS TRADICIONAIS**

**CURITIBA**

**2011**

JUSSARA PATRICIA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DE NOVOS MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE  
PULMONAR EM COMPARAÇÃO COM MÉTODOS TRADICIONAIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Keite Nogueira

CURITIBA

2011

## RESUMO

**Introdução:** Como um problema de saúde pública, a tuberculose (TB) é uma doença que atinge diversas populações em vários países, sendo de essencial importância o diagnóstico rápido e específico para o início do tratamento e conseqüentemente o controle da propagação da doença. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento de métodos laboratoriais novos e tradicionais para avaliação do avanço no diagnóstico dessa doença. **Material e métodos:** Para realização do trabalho foram pesquisados nos bancos de dados Scielo, Pubmed e Medline artigos publicados no período de 2006 a 2011. **Resultados:** O meio de Löwenstein-Jensen é o método de referencia ou padrão ouro para cultivo do *Mycobacterium tuberculosis*, porém o a realização do cultivo da cultura leva cerca de 8 a 10 semanas. Já a técnica de PCR identifica em horas genes específicos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e comparada à cultura tem maior capacidade de detecção em amostras paucibacilares. **Discussão:** Apesar de técnicas com PCR serem de maior custo, o diagnóstico rápido garante o início da terapia adequada. **Conclusão:** A implantação de novas técnicas laboratoriais faz-se necessário diante deste cenário de realidade precária dos laboratórios clínicos e desta epidemia, que é a tuberculose. Para esta finalidade o método de PCR demonstrou ser o exame mais rápido para identificação da *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de escarro, para diagnóstico da tuberculose pulmonar.

**PALAVRAS-CHAVES** – tuberculose, pulmonar, PCR, métodos tradicionais.

## ABSTRACT

**Introduction:** As a public health problem, tuberculosis (TB) is a disease that affects different populations in various countries, being of paramount importance to the rapid and specific diagnosis to the start of treatment and consequently control the spread of disease. **Objective:** The objective of this study was a survey of new and traditional laboratory methods for evaluation of progress in the diagnosis of this disease. **Material and method:** To perform the study were searched in databases Scielo, Pubmed and Medline articles published from 2006 to 2011. **Results:** The Lowenstein-Jensen medium is the reference method or gold standard for cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*, but holding him to the cultivation of the crop takes about 80 to 10 weeks. Since the PCR technique identifies specific genes in hour of strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative culture has greater capacity to detect smear negative samples. **Discussion:** Although PCR techniques are more expensive, rapid diagnosis ensures the initiation of appropriate therapy. **Conclusions:** The implementation of new laboratory techniques are needed to face this scenario precarious reality of this epidemic and clinical laboratories, which is tuberculosis. For this purpose the PCR method proved to be the rapid tests for identification of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples for diagnosis of pulmonary tuberculosis.

**KEYWORDS** - tuberculosis, lung, PCR, traditional methods.

## 1. INTRODUÇÃO

Como um problema de saúde pública, a tuberculose (TB) é uma doença que atinge diversas populações em vários países, sendo de essencial importância o diagnóstico rápido e específico para o início do tratamento e conseqüentemente o controle da propagação da doença (Borges *et al.* 2004).

O controle da doença é limitado, devido a falta ferramentas adequadas disponíveis para o diagnóstico da tuberculose na maioria dos laboratórios (Cunningham, 2008). Vários fatores têm contribuído para o atraso no diagnóstico da tuberculose pulmonar, como a falta de solicitações médicas, resultados laboratoriais falsos negativos, métodos de identificação demorados e doenças imunossupressoras (Legesse *et al.*, 2010).

No Brasil a escassez de métodos com novas tecnologias implantadas nos laboratórios, faz com que o diagnóstico ainda seja demorado e nem sempre correto. As políticas públicas deveriam priorizar estudos clínicos com novas técnicas, afim de definir utilidade clínica, custo-eficácia e implantação no SUS (Sistema Único de Saúde) (Kritski, 2006). Existe uma proposta para implantação no SUS de detecção por PCR, pois os métodos utilizados na prática clínica para diagnóstico da tuberculose pulmonar atualmente não passam por atualizações há anos (Teixeira *et al.*, 2007). Apenas alguns laboratórios de referências vêm utilizando novas técnicas (Borges *et al.*, 2004).

A tuberculose pulmonar é a forma clínica, que mais afeta a população mundial, cerca de 90% dos casos (Bezerra *et al.*, 2009; Ireton *et al.*, 2010; Mattos *et al.*, 2006), por isso muitas pesquisas com novos métodos ou melhoramento nos métodos convencionais para diagnóstico da tuberculose pulmonar tem sido realizados em vários países (Agapito *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2010; Millington *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2006). Pesquisas com biologia molecular e imunologia mostram que novos métodos parecem ter grande futuro neste meio, mas que muitos desses ainda estão sendo associadas aos métodos convencionais (Chagas *et al.*, 2010).

Os mecanismos imunológicos ainda pouco explorados contribuem para o desenvolvimento de diagnósticos específicos para tuberculose, seja pulmonar ou não (Bezerra *et al.*, 2009; Moutinho, 2011).

A biologia molecular através da técnica de PCR tem mostrado que a identificação do marcador molecular da *Mycobacterium tuberculosis* tem maior sensibilidade do que os métodos tradicionais, auxiliando no diagnóstico de pacientes que não haviam sido esclarecidos (Chagas *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2008; Marchi *et al.*, 2008). E ao amplificar o gene de resistência a medicamentos do *Mycobacterium tuberculosis*, pode detectar rapidamente as cepas que sofreram a mutação diagnosticando pacientes com resistência a medicamentos (Chen *et al.*, 2010). Os métodos moleculares são ferramentas eficientes de diagnósticos nos serviços de saúde (Marchi *et al.*, 2008), podendo também ser associadas a métodos de culturas. A combinação de técnicas tradicionais e de biologia molecular pode proporcionar um diagnóstico mais rápido para tuberculose pulmonar, diminuindo o risco de transmissão e intervenção rápida com tratamento (Chagas *et al.*, 2010).

Um bom teste ou teste ideal seria aquele que tivesse elevada sensibilidade e especificidade, fosse rápido e custasse pouco. Para o SUS o método de PCR ainda é caro para ser utilizado, a não ser que possua vantagens em relação à metodologia convencional (Lima *et al.*, 2008).

Métodos e tecnologias que aumentem a sensibilidade e especificidade, diminuam o tempo de positividade das técnicas convencionais podem ser de grande validade para os laboratórios que utilizam dessa técnica como método fundamental para diagnóstico da doença (Agapito *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2007).

Diante deste contexto o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento de métodos laboratoriais novos e tradicionais nas áreas de biologia molecular, imunologia e bacteriologia, que estão sendo realizados em vários países inclusive no Brasil, para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram pesquisados nos bancos de dados Scielo, Pubmed e Medline artigos publicados no período de janeiro de 2006 a novembro de 2011 com as palavras “métodos de diagnóstico” e “tuberculose pulmonar”, na qual abordassem métodos de diagnósticos laboratoriais da tuberculose pulmonar, de rotina, métodos em teste, métodos comparativos de especificidade e sensibilidade.

Os trabalhos analisados neste artigo tiveram metodologias utilizadas com todos os tipos de populações, indiferente de raças ou idade (conforme a abordagem do trabalho), em regiões endêmicas ou não, com pacientes HIV positivos ou não, com suspeitas ou confirmação de tuberculose pulmonar, e os tipos de métodos analisados foram dentro de áreas da imunologia, bacteriologia e biologia molecular para diagnóstico da tuberculose pulmonar com identificação ou não do *Mycobacterium tuberculosis*.

### **3. RESULTADOS**

#### **Fase pré-analítica**

As amostras mais utilizadas nos exames bacteriológicos e de biologia molecular é o escarro obtido por expectoração espontânea (Lima *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2006). Nas unidades de saúde durante a rotina é realizada apenas uma coleta de escarro espontâneo por paciente, por isso a qualidade da amostra e da coleta é de fundamental importância para execução das análises, podendo elevar a sensibilidade das técnicas de PCR e bacteriológicas (Assis *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008). A contaminação de uma amostra pode ser de até 21%, caso essas amostras não forem colhidas de maneira adequada (Maciel *et al.*, 2009). Também são amostras aceitáveis escarro induzido, lavado broncoalveolar (LBA) e outros (Garcia *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2010).

Os testes imunológicos utilizam amostras de sangue para diagnóstico de tuberculose pulmonar levam cerca de 4 a 6 horas da coleta até o processamento por método de Elisa (Legesse *et al.*, 2011).

O transporte da amostra de escarro deve ser realizada a 4°C (Legesse *et al.*, 2010 e 2011), locais onde as amostras são transportadas em temperatura ambiente por 2 a 4 dias obtém-se maiores taxas de contaminação (Rivas *et al.*, 2010).

#### **Baciloscopia direta de escarro**

A identificação de casos da doença é realizada principalmente pelo método de baciloscopia, pois é uma técnica rápida e exige instalações laboratoriais mais simples (Gupta *et al.*, 2010).

O método mais utilizado é a coloração Ziehl-Neelsen (ZN), que baseia-se na capacidade do bacilo de reter a fucsina após a coloração a quente e posterior tratamento com álcool ácido. O método possui baixa sensibilidade em pacientes HIV positivos (Diandé *et al.*, 2008), porém é uma técnica de baixo custo e ainda muito utilizada para diagnóstico rápido em pacientes suspeitos (Agapito *et al.*, 2009; Diandé *et al.*, 2008). Em um dos trabalhos consultados, a baciloscopia identificou 41 (69%) amostras positivas para BAAR (bacilo álcool ácido resistente) dos 59 analisados (Moreira *et al.*, 2011).

Algumas metodologias alternativas vêm sendo utilizadas com sucesso, como método de coloração de fluorescência, método de coloração de Gabbet e método modificado de coloração. O método de Gabbet utiliza coloração de carbol-fucsina e contracorado com azul de metileno, a etapa de descoloração é combinada com contra-coloração. Já o método de coloração modificada também utiliza carbol-fucsina, mas é contra-corado com solução descolorante modificada, ambos os métodos não utilizam calor (Gupta *et al.*, 2010).

O método de fluorescência utiliza auramina como corante fluorescente, não precisa que as amostras sejam descontaminadas, não utiliza calor, mais tem um alto valor de manutenção em equipamentos. O método com auramina foi o que mais identificou amostras positivas (16) comparadas aos métodos de Gabbet (13) e método modificado (15) (Gupta *et al.*, 2010). A sensibilidade do exame direto com auramina determinada por Syre *et al.* (2009) foi de 49% (30/61).

No método de auramina os bacilos aparecem como bastões fluorescentes amarelo-cítrico, e o fundo se destaca por ser de coloração escura, ao contrário de outros métodos que aparecem com imagens fracas podendo explicar os resultados falsos-negativos (Gupta *et al.*, 2010). Comparando-se o método de auramina com Ziehl-Neelsen foi encontrada maior sensibilidade para o primeiro (58%) com menor (54%) para o segundo. O tempo de realização das técnicas são diferentes, a coloração de auramina leva de 1 a 2 minutos e Ziehl-Neelsen de 10 a 15 minutos, sendo a acurária das duas técnicas semelhantes (Lima *et al.*, 2008).

Um protótipo que visa aumentar a leitura de microscopia de fluorescência com auramina utilizando grânulos magnéticos que se liga seletivamente a micobactéria, foi comparado com concentrado de auramina e coloração de Ziehl-Neelsen. O protótipo magnético obteve 65% de sensibilidade e 89% de especificidade, a

coloração de Ziehl-Neelsen obteve 51% e 99% respectivamente e o concentrado de auramina obteve o melhor resultado entre as técnicas testadas apresentando 75% de sensibilidade e 94% de especificidade. As técnicas de microscopia com auramina são mais complexas, exigem mais etapas e equipamentos, o tempo de execução é maior, porém são mais sensíveis (Albert *et al.*, 2011).

### **Descontaminação da amostra**

A descontaminação da amostra de escarro mais utilizada é o método Petroff, que utiliza NaOH-NALC (hidróxido de sódio e n-acetil cisteína) a 4% por tempo mínimo de exposição de 2 minutos (Agapito *et al.*, 2009), centrifuga por 20 minutos e neutraliza com HCl (ácido clorídrico) (Jaspe *et al.*, 2009); este método é muito utilizada como padrão ouro, para descontaminação das amostras de escarro antes do cultivo em Löwenstein-Jensen (Rivas *et al.*, 2010).

O método Kudoh de descontaminação é realizado com o contato do swab com a amostra imerso em solução de NaOH 4% em tubo de ensaio, permanecendo no tubo por 2 minutos, e inoculado diretamente em tubos contendo meio de Ogawa, e não utiliza centrifugação. Esse método tem mostrado um bom desempenho em amostras que aguardam de 2 a 4 dias para realização de cultura em meio Ogawa, em volumes grandes de amostras e baixo custo (Jaspe *et al.*, 2009). O método Kudoh obteve 100% de sensibilidade e 99% de acurácia comparado ao método NALC-NaOH (Rivas *et al.*, 2010).

Outros descontaminantes também tem sido utilizados, como a solução de cloreto de cetilpiridínio, utilizados para descontaminar amostras de escarro pulmonar que aguardam cerca de 5 dias para serem submetidas a métodos de PCR (Santos *et al.*, 2006). O lauril-sulfato de sódio também é muito utilizado antes do sementeado de Löwenstein-Jensen, porém a descontaminação deixa o bacilo inviável (Lima *et al.*, 2007).

### **Cultura**

A cultura em meio de Löwenstein-Jensen (LJ) é o método de referência ou padrão ouro para cultivo do *Mycobacterium tuberculosis*. Sua composição principal é a base ovo, porém crescimento do cultivo leva cerca de 8 a 10 semanas em estufa a 37°C para se tornar visível (Legesse *et al.*, 2010; Marchi *et al.*, 2008; Salem *et al.*,

2007). O crescimento pode ocorrer em tempo menor de até 14 dias em tubos sólidos de Löwenstein-Jensen apenas quando as amostras são processadas no máximo 2 horas após a coleta, com isso a degradação de micobactéria pela ação de enzimas do próprio escarro é menor (Chagas *et al.*, 2010). O meio LJ se contamina com outros micro-organismos de crescimento rápido, possui baixa sensibilidade em pacientes que já iniciaram o tratamento e a detecção da micobactéria ocorre quando existem no mínimo 10 UFC/ml no escarro (Lima *et al.*, 2007).

O método de Ogawa baseia-se no LJ, porém com formulação modificada e tem sido utilizado como método de cultura em alguns laboratórios brasileiros no diagnóstico da tuberculose pulmonar (Maciel *et al.*, 2009). O meio em tubo acidificado a base de ovo possui coloração verde, devido ao verde malaquita que suprime o crescimento de micro-organismos não micobacterianos (Salem *et al.*, 2007). Algumas das vantagens do meio Ogawa é a facilidade de semeadura, processo rápido de descontaminação e não utiliza centrifuga (Agapito *et al.*, 2009). O método Kudoh Ogawa é mais barato e sua execução é mais simples não requer muita infra- estrutura. Porém uma morfologia e crescimento ideal das culturas devem ser ásperas e secas, e o estudo de Rivas *et al.*, 2010 mostrou que o meio modificado de Löwenstein-Jensen teve um crescimento luxuoso comparado ao meio mais pobre do método de Ogawa.

Outros meios de cultura também tem sido testados como a combinação do meio Middlebrook7H11 (caseína enzimática hidrolisada) com ágar sangue, essa associação melhorou o rendimento do cultivo da micobactéria e o tempo de crescimento mínimo foi de 7 dias e máximo 28 dias para os meios combinados e 14 dias e 42 dias para no meio Ogawa, sendo a sensibilidade de 100% para os meios testados (Agapito *et al.*, 2009).

Os equipamentos automatizados ou semi-automatizados, que visam o isolamento e diferenciação entre o complexo do *Mycobacterium tuberculosis* utilizando o meio de cultura líquido middlebrook, também apresentam diminuição do tempo de detecção da micobactéria. O método radiométrico utilizando NAP (p-nitro-alfa-acetilamino-beta-hidroxiopropiofenona) no sistema BACTEC 460 obtém seus resultados para diagnóstico da tuberculose em 15 dias, mas o custo dos equipamentos é alto (Lima *et al.*, 2008).

Um método alternativo relatado por Salem *et al.*, 2007 combina 3 técnicas: descontaminação de Petroff e Kudoh e o meio Ogawa (PKO), possui uma sensibilidade de 91%, elimina a etapa de neutralização da amostra e permite um crescimento em 15 dias ou menos. Adequado para rede de saúde pública, pois tem um custo diário menor que técnicas automatizadas, reduz etapas de manipulação de amostras e diminui a produção de aerossóis no ambiente.

### **Novos métodos de biologia molecular**

Vários testes de biologia molecular vêm sendo propostos como os testes rápidos de PCR “*in house*” que utilizam o gene alvo IS6110 como o PCR *dot-blot* e *nested-PCR*. Também são usados *nested-PCR* que amplifica outro gene o antígeno b, outros testes rápidos que utilizam rRNA23S como gene alvo (GTMD), outras metodologias com PCR que utilizam 16SrDNA como gene alvo, PCR *Real-time* e testes com amplificação isotérmica (LAM) para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Os métodos de PCR “*in house*” baseam-se na amplificação de ácidos nucléicos do gene de inserção IS1610 do *Mycobacterium tuberculosis*, sendo uma técnica rápida para detecção do fragmento de DNA do micro-organismo na amostra de escarro em pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar (Lima *et al.*, 2007). Dos genes alvos já relatados o gene IS6110 que possui 1350 bases exclusivas do complexo *Mycobactérium tuberculosis*, constituem os testes de maior sensibilidade (Assis *et al.*, 2007; Chagas *et al.*, 2010; Scherer *et al.*, 2010). O trabalho de Santos *et al.* (2006) obteve resultados no mesmo dia utilizando PCR “*in house*” com gene alvo IS1610, em população indígena com 87% de sensibilidade e 95% de especificidade. Neste mesmo estudo foram obtido 14% de resultados falsos-negativos da PCR nas amostras clínicas de pacientes indígenas, pois conforme o autor tais resultados podem sugerir a existência de micobactérias atípicas com regiões homólogas do DNA do *Mycobacterium tuberculosis* (Kritski, 2006; Santos *et al.*, 2006). Outras técnicas utilizando PCR pode também identificar não só o gene alvo IS1610 da *Mycobacterium tuberculosis*, bem como outras micobactérias não tuberculosas (Marchi *et al.*, 2008).

A PCR *dot-blot* é uma técnica de PCR “*in house*” onde a amplificação simples ocorre em uma membrana de nylon, utilizando-se de hibridização e a revelação é

feita pelo sistema colorimétrico. O PCR *dot-blot* obteve 63% de sensibilidade e 84% de especificidade comparado com outro teste “*in house*” (PCR-AG) que não utiliza o sistema colorimétrico para revelação, foi de 47% e 85% respectivamente. As amostras analisadas neste estudo eram de pacientes que já haviam recebido tratamento prévio de tuberculose pulmonar. A técnica de PCR “*in house*” mostrou ter uma sensibilidade maior de detecção (inclusive em pacientes HIV positivo), maior rapidez e custo menor que os sistemas automatizados de amplificação de ácidos nucléicos (Syre *et al.*, 2009).

O *nested-PCR* é uma técnica de dupla amplificação sucessiva de ácidos nucléicos, onde amplifica uma sequência de fragmento alvo já previamente amplificado, e quando é realizada “*in house*” utiliza como alvo a sequência de inserção IS1610. O estudo de Assis *et al.* (2007) com *nested-PCR* “*in house*” obteve 98% de sensibilidade e 15% de especificidade. Já o *nested-PCR* com gene alvo antígeno b, é uma técnica de dupla amplificação, na qual se utiliza outra sequência nucleotídea que está presente em cepas do complexo da *Mycobacterium tuberculosis* e após a amplificação é submetido à eletroforese de gel agarose. O *nested-PCR* é uma técnica rápida e apresenta sensibilidade equivalente a cultura. Em um estudo de Lima *et al.* 2007, obteve 96% (116/121) de sensibilidade e 48% (11/23) de especificidade, sendo a cultura 98% e 100% respectivamente. Neste mesmo sentido outro estudo obteve 100/116 (86%) de sensibilidade e 9/20 (45%) de especificidade de *nested-PCR* com gene alvo antígeno b (Assis *et al.*, 2007).

A técnica *nested-PCR* seja com a amplificação do gene IS1610 ou antígeno b pode conciliar aumento de sensibilidade e especificidade, é uma técnica rápida de detecção de sequência genômica, pode aumentar mil vezes o limite de detecção do gene do micro-organismo na segunda reação e identificar casos de tuberculose pulmonar paucibacilar. Todavia a técnica possui alguns agravantes, presença de substâncias inibidoras de PCR pode inibir a amplificação da enzima polimerase, gera altas taxas de resultados falso-positivos e apresenta baixa especificidade (Assis *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2007).

O teste GTMD ensaio comercial que seqüência rRNA23S (teste recentemente desenvolvido com potencial de identificar além do complexo de micobactéria mais 4 micobactérias atípicas), também apresenta bons resultados, das 61 amostras pulmonares analisadas o teste identificou 54 positivas das 31 amostras negativas

por baciloscopia. O teste é promissor para detecção do complexo de micobactérias, possui um controle de inibição de amostras (IAC), gera resultados em horas, identifica micobactérias atípicas, mas possui um alto valor de compra, sendo inviável para países de baixa de renda (Espy et al., 2006).

Um método capaz de melhorar a capacidade de detecção do PCR com gene alvo 16SrDNA foi proposto por Chagas *et al.* sendo as colônias do *Mycobacterium tuberculosis* extraídas diretamente da cultura de LJ, o PCR amplificou o DNA da micobactéria em 17 dias de cultivo, reduzindo assim o tempo de diagnóstico em meio sólido de LJ e obtendo 100% de sensibilidade com a associação das técnicas (Chagas *et al.*, 2010).

O PCR real-time utiliza-se do artifício da fluorescência emitida pelo sybr green (corante que detecta os bacilos álcool ácidos resistentes) que identifica a dupla fita de DNA do *Mycobacterium tuberculosis*, é sensível, emite resultados em 3 horas, tem uma execução simplificada, mas exige experiência para desenvolver e validar a técnica. A técnica oferece também potencial de detecção de gene de mutação a drogas com resultados em horas (Espy *et al.*, 2006). No estudo de Lima *et al.* 2008, o *kit* real-time PCR system testado obteve os melhores resultados de sensibilidade e especificidade (78% e 100% respectivamente) em amostras com baciloscopia negativa e positiva, comparada a outros *kits* de PCR (Lima *et al.*, 2008).

A metodologia de LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) uma técnica nova que amplifica o DNA do gene alvo rapidamente sob condições isotérmicas, são lidos em sybr green e confirma-se com eletroforese em gel de agarose. O LAMP obteve 79% de sensibilidade e 94% de especificidade sendo comparado com baciloscopia direta de fluorescência 82% e 97% respectivamente. A técnica é acessível, de baixo custo, pois não utiliza termocicladores caros, e os resultados saem no mesmo dia (George *et al.*, 2011).

A técnica de PCR também é capaz de identificar 13 tipos de mutações em 32 cepas resistentes, com a amplificação dos fragmentos do gene *rpoB*, responsável pela mutação na resistência a rifampicina (Chen *et al.*, 2010) e sendo identificado também por PCR em tempo real o gene alvo de mutação *katG*, responsável pela resistência a isoniaziada (Espy *et al.*, 2006), dois importantes medicamentos para tratamento de tuberculose pulmonar.

A biologia molecular pode ser considerada uma técnica auxiliar das técnicas convencionais para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, mas sempre considerando o histórico do paciente (para verificar se já teve algum contato com o tratamento), além de um eficiente controle de qualidade (para evitar contaminações cruzadas durante os ensaios) (Assis et al., 2007). A contaminação cruzada em testes com PCR altera seus resultados (Scherer et al., 2011).

A técnica de PCR comparada a cultura tem maior capacidade de detecção em amostras paucibacilares, do que a pesquisa direta (Lima et al., 2008), sendo que essas amostras precisam de um diagnóstico rápido (Assis et al., 2007). Por outro lado estudos demonstram que a sensibilidade dos testes de ácidos nucleicos são menores quando a baciloscopia é negativa (Espy et al., 2006; Scherer et al., 2011). Da mesma forma o PCR em amostras negativas para baciloscopia direta perde 50% de sensibilidade, enquanto que para as amostras positivas em baciloscopia direta a sensibilidade aumenta aproximadamente 50% (Lima et al., 2008). Paciente paucibacilar pode ser uma limitação da técnica, onde o PCR pode não ser capaz de detectar quantidades pequenas de bacilos nas amostras (Marchi et al., 2008).

Os métodos moleculares têm algumas limitações, como seu alto custo, necessidade de local e equipamentos adequados e profissionais capacitados, além da dificuldade de reprodutibilidade em larga escala (Bezerra et al., 2009).

### **Teste tuberculínico e outros métodos de diagnósticos em imunologia**

O teste rápido com a proteína PPD (protein purified derivated) ainda é o mais utilizado. O teste tuberculínico estimula o sistema imunológico a responder a proteína quando é aplicada na pele e o resultado é medir o endurecimento, sendo  $\geq 10$  mm reativo para tuberculose pulmonar (Legesse et al., 2011), porém em outros locais se considera positivo quando mede a partir de  $\geq 5$  (Latorre et al., 2010). Mas sua sensibilidade é menor para diagnóstico de infecção latente, principalmente em pacientes vacinados com bacilo de Camette-Gérin (BCG) (Legesse et al., 2011). Em contrapartida o teste tuberculínico foi o teste de maior sensibilidade (12%) para diagnosticar a infecção latente comparado a dois testes de resposta de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) em pacientes HIV positivos (Legesse et al., 2011).

Testes de IFN- $\gamma$  baseam-se no estímulo do antígeno em produzir citocinas do sistema imune que ativam os linfócitos T e macrófagos (Moutinho, 2011), essas

citocinas chamadas de IFN- $\gamma$ , é quantificada pelo método de Elisa (Cabral *et al.*, 2010). A utilização desses ensaios (IFN- $\gamma$ ) em combinação com teste tuberculínico poder ser um método útil para o diagnóstico da infecção latente em pacientes HIV positivos, sendo os ensaios de IFN- $\gamma$  menos influenciados pela vacina BCG (Latorre *et al.*, 2010). Um dos testes de liberação rápido que quantifica IFN- $\gamma$  o Quantiferon-TB Gold in tube (QFTGIT) obteve 64% de sensibilidade e 37% de especificidade com o valor de corte recomendado pelo fabricante, e quando diminuiu este valor aumentou a sensibilidade do teste para 77% (Legesse *et al.*, 2010). Assim como dos 570 amostras analisadas 363 (64%) foram positivas por QFTGIT (Legesse *et al.*, 2011), obtendo assim baixa sensibilidade.

Os testes de liberação rápido são testes de detecção de anticorpos estimulados por antígenos específicos, são grandes técnicas promissoras, mas ainda nem todos os testes foram aprovados pela FDA para serem utilizados, pois não são reproduzíveis, tem sensibilidade pobre (Ireton *et al.*, 2010) e seu uso é principalmente para diagnosticar infecção latente de tuberculose pulmonar (Legesse *et al.*, 2011). Os testes com marcador da IgA utilizado para o diagnóstico da tuberculose pulmonar utilizando o antígeno glicolípido para análise de teste com Elisa. Foi obtido 100% de especificidade e 88% de sensibilidade, comparado a outros dois antígenos, detectando 91% dos casos positivos, porém a resposta é influenciadas por características e deficiências genéticas do sistema imunológico (Bezerra *et al.*, 2009).

Os testes rápidos de imunologia associados à baciloscopia melhora a sensibilidade diagnóstica em 14% (Cunningham, 2008).

Os testes sorológicos são rápidos e sensíveis, fácil quanto à execução da técnica e mais baratos que os métodos moleculares de amplificação de ácidos nucléicos (Bezerra *et al.*, 2009), todavia ainda é preciso mais estudos para se comprovar sua eficácia.

1 - Tabela de vantagens e desvantagens dos métodos tradicionais e novos

Método	Sensibilidade	Especificidade	Vantagens	Desvantagens	Referências
Coloração de ZN	51% e 69%	99%	Baixo custo.	Sensibilidade diminui em pacientes HIV positivos.	Moreira <i>et al.</i> , 2010; Agapito <i>et al.</i> , 2009; Diandé <i>et al.</i> , 2008; Albert <i>et al.</i> , 2011.
Método Fluorescência (auramina)	58%	100%	Não precisa de descontaminação, sem calor e execução rápida.	Alto custo.	Lima <i>et al.</i> , 2008; Gupta <i>et al.</i> , 2010; Syre <i>et al.</i> , 2009.
Método de Gabbet e Coloração modificada	81% e 94%	100%	Não utiliza calor e fácil realização.	ND.	Gupta <i>et al.</i> , 2010.
Método Fluorescência auramina concentrado	75%	94%	Mais sensível.	Maior tempo de execução e mais complexo.	Albert <i>et al.</i> , 2011.
Protótipo com grânulos magnéticos	65%	89%	Mais sensível.	Maior tempo de execução e mais complexo.	Albert <i>et al.</i> , 2011.
Cultura em LJ	100%	100%	Meio específico para <i>M. tuberculosis</i> .	8 a 10 semanas para o resultado, sensibilidade diminui em pacientes em tratamento.	Marchi <i>et al.</i> , 2008; Legesse <i>et al.</i> , 2010; Lima <i>et al.</i> , 2007.
Cultura em meio Ogawa Kudoh	100%	99%	Menor custo, menor tempo de descontaminação, não utiliza centrifugação.	Tempo de crescimento 14 a 42 dias.	Maciel <i>et al.</i> , 2008, Agapito <i>et al.</i> , 2009.
Meio de middlebrook 7H11 associado com Agar sangue	100%	ND	Menor tempo de crescimento de 7 a 28 dias.	Pouco específico.	Agapito <i>et al.</i> , 2009.
PKO	91%	ND	Baixo custo, elimina a etapa de neutralização e crescimento em 15 dias.	ND.	Salem <i>et al.</i> , 2007.
PCR "in house" gene de inserção IS1610	87%	95%	Deteção rápida e de maior sensibilidade entre os genes analisados.	14% de resultados falsos-negativos.	Santos <i>et al.</i> , 2006.
PCR dot-blot	63%	84%	Maior sensibilidade de deteção em pacientes em tratamento em menor tempo.	Alto custo e utiliza sistema colorimétrico.	Marchi <i>et al.</i> , 2008.
Nestled PCR gene de inserção IS6110 e antígeno b.	98% e 96%	15% e 48%	Mais rápido, mais sensível.	Alto custo, presença de inibidor de PCR, altos falsos-positivos e baixa especificidade.	Assis <i>et al.</i> , 2007; Lima <i>et al.</i> , 2007.
Kit Real-time PCR	78%	100%	Emite resultado em apenas 3 horas e detecta genes de mutação da micobactéria.	Alto custo, diminui sensibilidade em amostras paucibacilar e exige profissionais capacitados para validar a técnica.	Lima <i>et al.</i> , 2008; March <i>et al.</i> , 2008 e Lima <i>et al.</i> , 2007.
GTMD (rRNA 23S)	88%	ND	Resultados em horas, sensibilidade em amostras paucibacilares, possui inibidor de amostra, identifica micobactéria atípica.	Alto custo.	Epsy <i>et al.</i> , 2009.
LAMP	79%	94%	Técnica acessível, menor custo (não utiliza termocicladores caros) e mais rápida.	ND.	George <i>et al.</i> , 2011.
Teste tuberculínico	54%	ND	Teste rápido.	Diminui sensibilidade em HIV (+) e vacinados pela BCG.	Legesse <i>et al.</i> , 2011 e Moreira <i>et al.</i> , 2010, Cabral <i>et al.</i> , 2010.
Ensaio com Interferon Gama (QFTGIT)	64%	37%	Mais rápidos, mais baratos que as técnicas de PCR e detecta infecção latente.	Baixa sensibilidade e especificidade.	Legesse <i>et al.</i> , 2010.
Teste com marcador de IgA	100%	88%	Mais rápido e mais barato.	Limitação deficiências genéticas.	Bezerra <i>et al.</i> , 2009.

ND= não definido

#### 4. DISCUSSÃO

Dos métodos analisados os métodos de baciloscopia direta com auramina e PCR demonstraram ser os exames mais rápidos para identificação da *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de escarro, para diagnóstico da tuberculose pulmonar. Estes dois métodos obtiveram boa sensibilidade e especificidade em pacientes HIV positivos, já que eles são a maioria da população atingida pela doença (Koole *et al.*, 2011). Por outro lado ao associar agar sangue ao meio de middlebrook 7H11 foi obtido uma diminuição considerável do tempo de cultivo (Agapito *et al.*, 2009).

Entre as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos consiste na amplificação de uma região de fita dupla ou simples do DNA ou RNA, o gene de inserção que obteve a maior sensibilidade é o IS1610. A técnica tem algumas limitações quando as amostras são negativas para baciloscopia, porém permite um diagnóstico rápido (Espy *et al.*, 2006).

Os testes rápidos de imunologia também apresentaram diagnóstico rápido para tuberculose pulmonar, mas ainda nem todos são aprovados para uso em diagnóstico (Cunningham, 2008), pois não apresentam resultados importantes para estudos epidemiológicos (contato com o bacilo).

O diagnóstico rápido da tuberculose pulmonar se faz necessário para o controle da doença, pois a transmissão ocorre de pessoa a pessoa, e se dissemina rapidamente. Atualmente leva-se muito tempo para diagnosticar um paciente, pois a doença é confundida com outras doenças quando a tuberculose é aguda (Moreira *et al.*, 2011). No tempo decorrente entre o paciente procurar um médico, solicitar os exames até a expedição dos mesmos, esse paciente já disseminou a doença para outras pessoas.

O tratamento para tuberculose pulmonar é realizado com a administração da combinação de rifampicina-isoniazida-pirazinamida, que são medicamentos antituberculostáticos com reações adversas intensas e a fidelização do paciente com o tratamento fica a mercê de políticas públicas sociais de cada região (Moreira *et al.*, 2011). O tratamento é gratuito e pode ser adquirido em postos de saúde do município.

Apesar de técnicas com PCR possuírem maior custo, o diagnóstico rápido garante o início da terapia adequada, menor tempo de internamento, menor possibilidade de resistência a medicamentos e menor morbidade.

## 5. CONCLUSÃO

A implantação de novas técnicas laboratoriais faz-se necessário diante deste cenário de realidade precária dos laboratórios clínicos e desta epidemia. A técnica de PCR poderia ser de muita valia se implantada nos laboratórios de análises clínicas, inicialmente para associar com as técnicas tradicionais como em casos de amostras com baciloscopia negativa. O laboratório precisaria de profissionais capacitados, infra-estrutura e investimentos, que no início apresentariam custos altos, mas que a longo prazo esses custos seriam diminuídos com a adequação de diagnósticos não só mais rápidos como mais precisos também.

São necessários mais estudos para avaliação dos novos métodos que auxiliem no diagnóstico da doença, gerando resultados mais rápidos com maior sensibilidade e especificidade que reduzam o tempo das análises das amostras, para que o paciente possa iniciar o tratamento contra a tuberculose rapidamente.

## 6. REFERÊNCIAS

AGAPITO, J.; CUADROS, L.; TARRILLO, S.; SOTO, A. – **Evaluación Del medio middlebrook 7H11 asociado a sangre humana u ovina para La detección de *Mycobacterium tuberculosis* em muestras de esputo.** Ver. Peru Med. Exp. Salud Publica 26 (3):294-298, 2009.

ALBERT H.; ADEMUN P.; LUKYAMUZI G.; NYESIGA B.; MANABE Y.; JOLOBA M.; WILSON S.; PERKINS M. D. - **Feasibility of magnetic bead technology for concentration of mycobacteria in sputum prior to fluorescence microscopy.** BMC Infectious Diseases 11 (125):1-9, 2011.

ASSIS N. C. S.; LOPES M. L.; CARDOSO N. C.; COSTA M. M.; SOUSA C. O.; LIMA K. V. B. - **Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar.** J. Bras. Potol. Med. Lab. 43 (1): 1-7, 2007.

BEZERRA J. M.; BECK S. T.; KANUNFRE K. A.; LEITE O. M.; FERREIRA A. W. - **A study of IgA antibody response to different *Mycobacterium tuberculosis***

**antigens in the diagnosis and monitoring of pulmonary tuberculosis.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 13 (1): 53-58, 2009.

BORGES M.; CAFRUNE P. I.; POSSUELO L. G.; VALIM A. R. M.; RIBEIRO M. O.; ROSSETTI M. L. R. - **Análise molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de um centro de saúde ambulatorial em Porto Alegre, (RS).** J Bras Pneumol; 30(4): 448-454, 2004.

CABRAL V. R.; SOUZA C. F.; GUIMARÃES F. L. P.; SAAD M. H. F. - **Heterogeneidade de resposta por IFN- $\gamma$  a cepas clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* em humanos.** J Bras Pneumol. 36(4):494-497, 2010.

CHAGAS M.; SILVA R.M.; BAZZO M.L.; SANTOS J.I. - **The use of polymerase chain reaction for early diagnosis of tuberculosis in *Mycobacterium tuberculosis* culture.** Braz J Med Biol Res, 43(6): 543-548, 2010.

CHEN L.; GAN X.; LI N.; WANG J.; LI K.; ZHANG H. - **RpoB gene mutation profile in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guizhou, one of the highest incidence rate regions in China.** J Antimicrob Chemother 10: 1292-1301, 2010.

CUNNINGHAM J. - **Laboratory-based evaluation of 19 commercially available rapid diagnostic tests for tuberculosis** (Diagnostics evaluation series, 2). World Health Organization, 2008.

DIANDÈ, S.; TORREA, G.; OVATTARA, C.J.; SAWADOGO, L. T.; GUEYE, A.; MOURFOU, A.; OUEDRAOGO, F.; SAWADOGO, I.; NEBIÈ, B.; DINGTOUMDA, I.B.; TRAORÈ, A. S. – **Diagnostic yield and grading of acid fast bacilli from serial sputum smears of HIV-infected and uninfected tuberculosis patients in routine microscopy laboratory in Ouagadougou, Burkina Faso.** R. C. Méd. Biol. 7 (3):288-293, 2008.

ESPY M. J.; UHL J. R.; SLOAN L. M.; S. P. BUCKWALTER; JONES M. F.; VETTER E. A., YAO J. D. C.; WENGENACK N. L.; ROSENBLATT J. E.; COCKERILL III F. R.; SMITH T. F. - **Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing.** Clinical microbiology reviews, 19 (1):165-256, 2006.

GARCIA, S.B.; PERIN, C.; SILVEIRA, M.M.; VERGANI, G.; MENNA-BARRETOS, S.S.; DALCIN, P.T.R.- **Bacteriological analysis of induced sputum for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in the clinical practice of a general tertiary hospital.** Jornal Brasileiro de Pneumologia, 35 (11): 1092-1099, 2009.

GEORGE, G.; MONY, P.; KENNETH, J. – **Comparison of the efficacies of loop-mediated isothermal amplification, fluorescence smear microscopy and culture for the diagnosis of tuberculosis.** Plos one 6 (6): e 21007, 2011.

GUPTA, S.; SHENOY, V.P.; BAIRY, I.; MURALIDHARAN, S.- **Comparação entre três métodos de coloração a frio no diagnóstico primário de tuberculose: um estudo piloto.** Jornal Brasileiro de Pneumologia, 36 (5):612-616, 2010.

IMAZ M. S.; SCHMELLING M. F.; KAEMPFER S.; SPALLEK R.; SINGH M. - **Serodiagnosis of Tuberculosis: Specific Detection of Free and Complex-Dissociated Antibodies Anti- *Mycobacterium tuberculosis* Recombinant Antigens.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases 12(3): 234-244, 2008.

IRETON, G. C.; GREENWALD R.; LIANG H.; ESFANDIARI J.; LYASHCHENKO K. P.; REED S. G. - **Identification of *Mycobacterium tuberculosis* antigens of high serodiagnostic value.** Clinical and vaccine immunology, 17(10): 1539–1547, 2010.

JASPE R. C.; ROJAS Y. M.; FLORES L. A.; TORO E. SOFIA 1, TAKIFF H.; WAARD J. H. - **Evaluation of the Kudoh swab method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis* in rural areas.** Tropical Medicine and International Health 14 (4): 468-471, 2009.

KOOLE, O.; THAI, S.; KHUN, K. E.; PE, R.; GRIENSVEN, J. V.; APERS, L.; ENDE, J.V.D.; MAO, T.E.; LYNEN, L. – **Evaluation of the 2007 who guideline to improve the diagnosis of tuberculosis in Ambulatory HIV-positive adults.** J. Plos one 6 (4):e18502, 2011.

KRITSKI A. L. - **Evaluating the efficiency of polymerase chain reaction in diagnosing pulmonary tuberculosis in indigenous and non-indigenous patients.** J Bras Pneumol, 32(3): xiii- xiv, 2006.

LATORRE I.; LACASA X. M.; FONT R.; LACOMA A.; PUIG J.; TURAL C.; LITE J.; PRAT C.; CUCHI E.; AUSINA V.; DOMÍNGUEZ J. **IFN-g response on T-cell based assays in HIV infected patients for detection of tuberculosis infection.** BMC Infectious Diseases, 10:348, 2010.

LEGESSE M.; AMENI G.; MAMO G.; MEDHIN G.; BJUNE G.; ABEBE F. - **Performance of quantiferon-tb gold in-tube (QFTGIT) for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infection in afar pastoralists, Ethiopia.** BMC Infectious Diseases, 10:354, 2010.

LEGESSE M.; AMENI G.; MAMO G.; MEDHIN G.; BJUNE G.; ABEBE F. - **Community-based cross-sectional survey of latent tuberculosis infection in**

**Afar pastoralists, Ethiopia, using QuantiFERON-TB Gold In-Tube and tuberculin skin test.** BMC Infectious Diseases, 11:89, 2011.

LIMA K. V. B.; LOPES M. L.; LOUREIRO E. C. B.; COSTA M. M.; CARDOSO N. C.; LIMA G. L. F.; SOUSA M. S. - **Nested-PCR do gene que codifica o antígeno b aplicada ao diagnóstico da tuberculose pulmonar.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40(2): 212-215, 2007.

LIMA S. S. S.; CLEMENTE2 W. T.; PALACI M.; ROSA R. V.; ANTUNES C. M. F.; SERUFO J. C. - **Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo.** J. Bras. Pneumol., 34 (12):1056-1062, 2008.

MACIEL E. L. N.; PRADO T. N.; PERES R. L.; PALACI M.; JOHNSON J. L.; DIETZE R. - **Associação entre coleta de escarro guiada e taxas de contaminação de culturas para o diagnóstico de TB pulmonar.** J Bras Pneumol.;35(5):460-463, 2009.

MARCHI, A. M.; JUTTEL, I. D.; KAWACUBO, E. M.; DALMARCO, E. M.; BLATT, S. L.; CORDOVA, C. M. M. - **Evaluation of methods for detection and identification of *Mycobacterium* species in patients suspected of having pulmonary tuberculosis.** Brazilian Journal of Microbiology 39:613-618, 2008.

MATTOS, I.G.; RIBEIRO, M.O.; NETTO, I.C.O.; AZEVEDO, P.A. – **Tuberculosis: A study of 111 cases in an area of high prevalence in the extreme south of Brazil.** The Braz. J. of Inf. Diseases, 10(3):194-198, 2006.

MILLINGTON K. A.; FORTUNEC S. M., LOWA J., GARCESC A.; HINGLEY-WILSONA S. M.; WICKREMASINGHEB M.; KONB O. M.; LALVANIA A. - **Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1) - dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection.** PNAS 108 (14), 2011.

MOREIRA J.; FOCHESTATTO J. B.; MOREIRA A. L; PEREIRA M.; PORTO N.; HOCHHEGGER B. - **Pneumonia tuberculosa: um estudo de 59 casos confirmados microbiologicamente.** J. Bras Pneumol. 37(2): 232-237, 2011.

MOUTINHO I. L. D. - **Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença.** Rev Med Minas Gerais 21(1): 42-48, 2011.

OLSEN S-R; LONG R.; TYRRELL GJ.; KUNIMOTO D. - **Induced sputum for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: Is it useful in clinical practice?.** Can Respir J 17 (4): e81-e84, 2010.

RIVAS, C.; COITINHO, C.; DAFOND, V.; CORBO, M.; BALDJIAN, M. – **Performance of the Ogawa-Kudoh method for isolation of mycobacteria in a laboratory with large-scale workload.** Rev. Argentina de Microb. 42:87-90, 2010.

SALEM, J. I.; CARVALHO, C. M.; OGUSKU, M. M.; MAIA, R.; RUFFINO-NETTO, A. – **PKO – Alternative method for isolating mycobacteria from sputum.** Acta Amazonica 37 (3):419-424, 2007.

SANTOS R. M. C.; OGUSKU M. M.; MIRANDA J. M.; SANTOS M. C.; SALEM J. I. - **Avaliação da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes indígenas e não indígenas.** J Bras Pneumol. 32(3):234-240, 2006.

SCHERER L.C.; SPERHACKE R.D.; JARCZEWSKI C.; CAFRUNE P.; MICHELON C.T.; RUPENTHAL R.; RIBEIRO M. O.; RUFFINO NETTO A.; ROSSETTI M. LR; KRITSKI A. L. - **Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection.** BMC Pulmonary Medicine 11 (15):1-10, 2011.

SYRE H.; MYNEEDU V. P.; ARORA V. K.; GREWAL H. M. S. - **Direct Detection of Mycobacterial Species in Pulmonary Specimens by Two Rapid Amplification Tests, the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test and the GenoType Mycobacteria Direct Test.** J. of Clinical Microbiology 47 (11):3635-3639, 2009.

TEIXEIRA H. C.; ABRAMO C.; MUNK M. E. - **Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso.** J. Bras Pneumol. 33(3):323-334, 2007.